

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

**Modifikation der Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor Genexpression  
humaner mikrovaskulärer Endothelzellen unter dem  
Einfluss von Stress- und Geschlechtshormonen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Anna Maria Elisabeth Sautner

aus  
A-Melk

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatlerin: PD Dr. med. Ute Wilbert-Lampen

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Bernhard F. Becker

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Claudia Summo

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2015

Meinen Eltern

Gabriele und Dipl.Ing. Peter Sautner

in Liebe und Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	5
1.1 Epidemiologie und Definition der Atherosklerose.....	5
1.2 Aufbau der Arterienwand.....	5
1.3 Das Endothel .....	6
1.4 Die Atherogenese .....	8
1.5 Stress .....	12
1.5.1 Hauptachsen der Stressreaktion und dessen Hormone .....	12
1.5.1.1 Die HPA-Achse:.....	12
1.5.1.2 Die SAM-Achse .....	13
1.6 Psychosozialer Stress und Atherosklerose .....	13
1.7 Endothelin und seine Rezeptoren.....	16
1.8 Endothelin-1 .....	18
1.8.1 Endothelin-1 assoziierte kardiovaskuläre Pathologien .....	21
1.8.2 Pharmakotherapie des Endothelin-Systems .....	23
1.9 Stress und Endothelin-1 .....	25
1.10 Sexualhormone.....	26
1.10.1 Darstellung genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen von $\beta$ -Östradiol: .....	27
1.10.1.1 Signalwege via Östrogenrezeptor (ER).....	27

---

1.10.1.2 Alternative ER-unabhängige Signalwege: .....	28
1.10.2 Darstellung genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen von Testosteron .....	28
1.10.3 Einfluss der Aromatisierung .....	28
1.10.4 Geschlechtsspezifischer Einfluss auf das Endothelin-System .....	28
1.11 Fragestellung und Ziel der Arbeit .....	31
2. MATERIAL .....	32
2.1 Geräte .....	32
2.2 Labormaterial .....	32
2.3 Kulturmedium und Zusätze .....	32
2.4 Stimulanzen .....	33
2.5 Sonstiges .....	33
3. Methoden .....	34
3.1 Kultivierung und Passage von HMEC (humane mikrovaskuläre Endothelzelle) .....	34
3.2 Versuchsvorbereitung und Durchführung der Stimulationen .....	35
3.3 Isolierung der RNA aus HMEC und Herstellung von cDNA durch reverse Transkription .....	35
3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
3.5 Datenanalyse .....	37

---

3.6	Statistische Analyse.....	38
3.7	Graphische Darstellung im Balkendiagramm .....	38
4.	ERGEBNISSE .....	40
4.1	ET <sub>A</sub> -R Expression von HMEC unter Stresshormonstimulation .....	40
4.2	ET <sub>A</sub> -R Expression von HMEC unter Geschlechtshormonstimulation.....	42
4.3	ET <sub>A</sub> -R Expression von HMEC im Co-Stimulationsversuch.....	45
4.3.1	Geschlechtshormone und anschließend Zugabe von Stresshormonen .....	45
	β- Östradiol + Stresshormon (Cortisol / CRH / Noradrenalin) .....	45
	Testosteron + Stresshormon (Cortisol / CRH / Noradrenalin).....	47
4.3.2	Stresshormon und anschließend Zugabe von Geschlechtshormonen .....	49
4.4	ET <sub>A</sub> -R Expression von HMEC unter BQ-123.....	51
4.5	ET <sub>A</sub> -R Expression von HMEC unter ECE-Inhibitor (ECE-I).....	52
5.	DISKUSSION.....	53
5.1	Die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst .....	53
5.2	Der Endothelin <sub>A</sub> -Rezeptor unter Einfluss von Stresshormonen .....	54
5.2.1	Zeitverlauf des CRH-vermittelten Effekts .....	54
5.2.2	Zeitverlauf des Cortisol-vermittelten Effekts .....	56
5.2.3	Zeitverlauf des Noradrenalin-vermittelten Effekts .....	56
5.2.4	Die ET <sub>A</sub> -R Expression nach 48 Stunden – mögliche Erklärungen.....	57

---

5.2.5	Interaktion zwischen Stresshormonen, Stressimitatoren, dem vasoaktiven ET-1 und dem signalvermittelten ET <sub>A</sub> -Rezeptor .....	59
5.3	ET <sub>A</sub> -R unter dem Einfluss von Geschlechtshormonen .....	62
5.3.1	ET <sub>A</sub> -R unter dem Einfluss von $\beta$ -Östradiol .....	63
5.3.2	ET <sub>A</sub> -R unter dem Einfluss von Testosteron .....	64
5.3.3	Testosteron und $\beta$ -Östradiol – möglicher Einfluss der Aromatisierung... ..	65
5.4	ET <sub>A</sub> -R im Co-Stimulationsversuch (Geschlechtshormone + Stresshormone) .....	65
5.5	Der Einfluss des selektiven ET <sub>A</sub> -R Antagonisten BQ-123 .....	66
5.6	Der Einfluss des Endothelin-Konversionsenzym-Inhibitors .....	68
5.7	Ausblick .....	68
5.8	Limitation der Arbeit .....	69
6.	ZUSAMMENFASSUNG .....	70
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	72
8.	LITERATURVERZEICHNIS .....	74
9.	DANKSAGUNG .....	86
10.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....	87

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Epidemiologie und Definition der Atherosklerose

„2010: Herz-/Kreislauferkrankungen verursachten rund 41% aller Todesfälle.“

- so lautete die Überschrift der Pressemitteilung des statistischen Bundesamtes Deutschlands über die häufigsten Todesursachen seiner Bürger (Statistisches Bundesamt 2011). Somit verstarb fast jeder zweite Deutsche an den Folgen einer Herz-Kreislauferkrankung. Diese Zahlen lassen erkennen, dass Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems derzeit zu den wichtigsten humanmedizinischen Problemkreisen zählen, wobei sie als Folgeerscheinung bzw. Komplikation der Atherosklerose verstanden werden müssen.

Lobstein, deutscher Pathologe und Anatom, prägte 1833 erstmals den Begriff der Arteriosklerose (Rosenfeld 1989). Marchand führte 1904 den Terminus „Atherosklerose“ in die medizinische Fachliteratur ein (Blankenhorn and Kramsch 1989).

Während „Arteriosklerose“ (von griech. *artería* = Gefäß und *sklérynse* = Verhärtung) ganz allgemein für Gefäßverhärtung bzw. -verkalkung steht und eher als Überbegriff für alle sklerosierenden Gefäßerkrankungen, einschließlich der „Mönckeberg-Mediaverkalkung“ und der Arteriolsklerose, anzusehen ist, werden mit dem Begriff „Atherosklerose“ (griech. „athära“ = Grütze, syn. Atherom; „skleros“ = hart) die histomorphologischen Veränderungen der Intima (Atherom, Sklerose) in den Vordergrund gerückt. Die Atherosklerose kann als wichtigster und häufigster Subtyp der Arteriosklerose verstanden werden. Beide Termini werden aber häufig als Synonyme verwendet. Die World Health Organisation definiert die Atherosklerose als eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlehydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia (World Health Organization 1958).

Um das komplexe Geschehen des Entstehungsprozesses der Atherosklerose zu verstehen, muss zunächst der histologische Aufbau der Arterienwand veranschaulicht werden:

### 1.2 Aufbau der Arterienwand

Die Arterienwand besteht aus drei, je nach Arterientyp unterschiedlich stark ausgeprägten, konzentrischen Schichten. Von der blutführenden Seite aus betrachtet sind dies:



- 
- Tunica intima / interna (Intima)
  - Tunica media (Media)
  - Tunica adventitia / externa (Adventitia)

Die Intima besteht aus einer der Basalmembran aufliegenden einschichtigen Zellreihe, dem Endothel, und einer subendothelialen Bindegewebsschicht. Das Endothel bzw. die das Endothel bildenden Endothelzellen sind für die Blutdruckregulation von größter Wichtigkeit. Auch wird den Endothelzellen am Entstehungsprozess der Atherosklerose eine bedeutende Rolle beigemessen. Hierüber geben nachstehende Kapitel ausführliche Auskunft.

Die Media besteht aus ringförmig verlaufenden glatten Gefäßmuskelzellen und elastischen Faserlamellen. Je nach Arterientyp sind Muskelzellen und Faserlamellen unterschiedlich stark ausgeprägt. In den herznahen Gefäßen dominiert der faserreiche und elastische, in der Peripherie hingegen der muskuläre Arterientyp.

Die sich nach außen anschließende Adventitia setzt sich aus kollagenem und elastischem Bindegewebe zusammen (Lüllmann-Rauch 2009).

### **1.3 Das Endothel**

Das Endothel, welches Blut-, und Lymphgefäße als einschichtiges Plattenepithel auskleidet, besteht in seiner Gesamtheit aus ungefähr  $10^{13}$  Zellen. Somit macht es ca. 1,5% der Körpermasse des Erwachsenen aus (Triggle, Samuel et al. 2012). Abhängig vom zu versorgenden Organ und dessen Funktion sind drei Endotheltypen zu unterscheiden (Aird 2007; Aird 2007). Ihre Durchlässigkeit für die im Blut befindlichen Stoffe nimmt in unten genannter Reihenfolge zu:

- Kontinuierlich, nicht-fenestriert (Blutschranke)
- Kontinuierlich, fenestriert (Nierenglomerulus)
- Diskontinuierlich/ sinusoidal (Leber)

Diese morphologische Variabilität - man spricht auch von der sog. „endothelialen Heterogenität“ (Aird 2007) - spiegelt aber nur annähernd das breit gesteckte Aufgabenspektrum des Endothels

---

wieder. Es dient nicht bloß als semipermeable Membran für einen **kontrollierten Stoffaustausch** zwischen Blut und Geweben, sondern ist v.a. durch die Bildung zahlreicher hormonähnlicher Verbindungen ein wichtiger Signalgeber und ein unverzichtbares, multifunktionelles, parakrines, autokrines und endokrines Organ. Es synthetisiert **Wachstumsfaktoren** [vascular endothelial growth factor (VEGF), Insulin-like growth factor 1 (IGF1), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), fibroblast growth factor 1 (FGF1)] und anti-proliferative Mediatoren [C-type natriuretic peptide (CNP), Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)] und ist somit an der Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese wesentlich beteiligt (Nelson, Bagnato et al. 2003; Triggle, Samuel et al. 2012). Des Weiteren ermöglicht es über die Expression von **Adhäsionsmolekülen** wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) und VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) die Adhäsion und folglich die **Diapedese** von Leukozyten ins entzündliche Gewebe. Hierdurch spielt das Endothel bei inflammatorischen Vorgängen (Atherogenese) eine wichtige Rolle (Johnson-Leger, Aurrand-Lions et al. 2000). Weiters beeinflusst es die Fließfähigkeit (Barton and Yanagisawa 2008) des Blutes, u. a. durch Hemmung oder Aktivierung von **Gerinnungsprozessen** (Kooistra, Schrauwen et al. 1994; Aird 2007).

Aufgrund der Synthese des hochpotenten vasodilatierenden NO, des gefäßerweiternden Bradykinins und PGI<sub>2</sub> sowie des vasokonstriktorisches ET-1 (Triggle, Samuel et al. 2012) und Angiotensin II wird dem Endothel speziell im Bereich der kardiovaskulären Physiologie eine zentrale Rolle zugeschrieben: Ss reguliert - stimuliert durch vaskuläre Scherkräfte und Dehnungsreize - den **Gefäßtonus** und moduliert situationsangepasst und bedarfsorientiert die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der entsprechenden Organsysteme.

Angeichts dieses umfangreichen Repertoires an Mediatoren, der anatomischen Lage als Grenzschicht und der Fähigkeit Agonist und Antagonist zu bilden (Abb.1 modifiziert nach Pilz 2004), ist es nun nicht verwunderlich, dass das Endothel in seiner anatomischen Intaktheit und funktionalen Integrität durch die Einwirkung diversester Risikofaktoren geschädigt werden kann. Entsprechend dieser Vorstellung - einer pathophysiologisch veränderten Endotheleigenschaft - wurde der Begriff „endotheliale Dysfunktion“ vorgeschlagen. Sie wird als kausaler Faktor für die Entstehung vaskulärer Erkrankungen beschrieben und geht als initiiertes Ereignis morphologisch nachweisbaren atherosklerotischen Veränderungen voraus (Davignon and Ganz 2004).

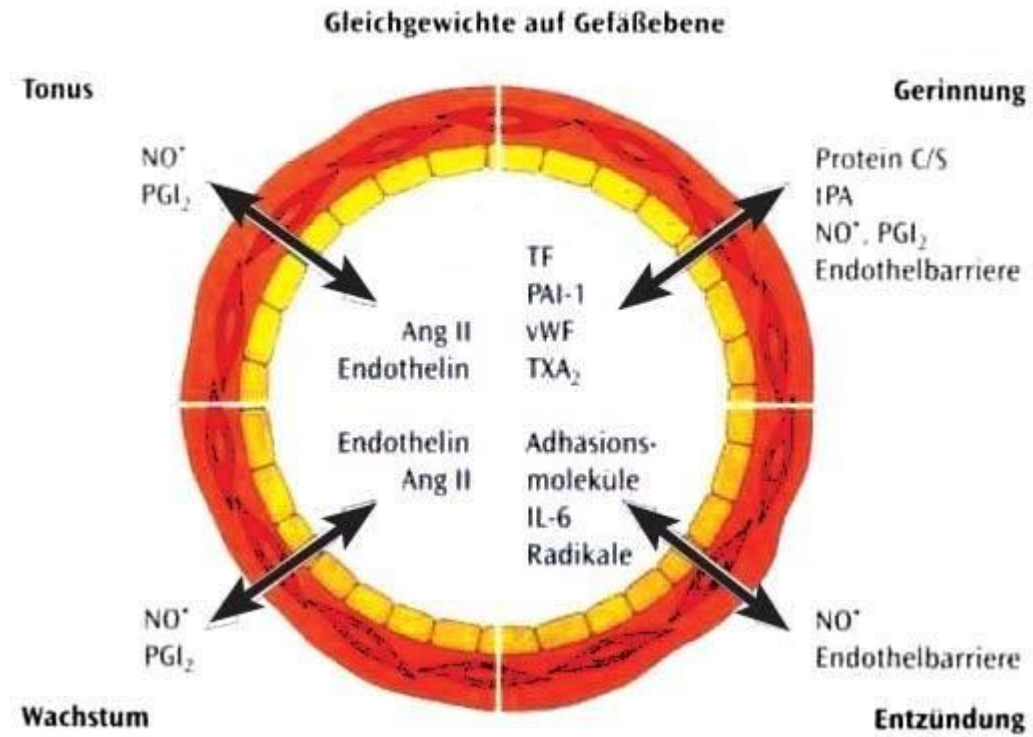


Abb.1 [modifiziert nach (Pilz 2004)] zeigt die vom intakten Endothel gebildeten Substanzen, welche für ein balanciertes Gleichgewicht zwischen Vasokonstriktion und Vasodilatation, Gerinnung und Fibrinolyse, Inflammation und Entzündungshemmung sowie Wachstum/Remodeling und Wachstumshemmung zuständig sind. Die im Gefäßlumen angeführten Substanzen führen bei Überwiegen oder länger andauerndem Bestehen zum pathologischen Geschehen. ANG II (Angiotensin II), TF (Tissue Factor), PAI-1 (Plasminogenaktivator Inhibitor-1), vWF (Von-Willebrand-Faktor), TXA<sub>2</sub> (Thromboxan), tPA (Tissue plasminogen activator), NO (Stickstoffmonoxid), PGI<sub>2</sub> (Prostazyklin), IL-6 (Interleukin-6)

## 1.4 Die Atherogenese

So komplex die Pathophysiologie der Atherosklerose ist, so verschieden und zahlreich sind auch die im Laufe der Zeit etablierten Lehrmeinungen und Erklärungsmodelle hierüber. Anhänger der Filtrationstheorie machten die durch Filtration verursachte intimale Anreicherung von Blutfetten hauptverantwortlich für die Entstehung der Atherosklerose. Dieser Grundgedanke wurde in der Perfusionstheorie aufgenommen, nach der die aufgenommenen Lipide bis in die Adventitia transportiert und den dort befindlichen Lymphkapillaren zugeführt werden (Tanimura, Cho et al. 1986; Tegos, Kalodiki et al. 2001). Die „Fibrin Incrustation Theory“ (thrombotische Theorie) nach Rokitansky, Duguid und Hand beschreibt einen auf der Endotheloberfläche oder auf bereits

---

bestehenden Plaque sich bildenden Thrombus, welcher durch Aufnahme und Reorganisation zur Intimaverdickung und Plaquebildung führt (Tegos, Kalodiki et al. 2001).

Ein modernes Modell der Atherogenese ist die Response to injury Hypothese. Ausgangspunkt dieser Theorie ist die Endothelschädigung bzw. eine Endotheldysfunktion ( $\text{NO}\downarrow$ ,  $\text{ET-1}\uparrow$ , Verlust der Vaso-Reaktivität), verursacht durch schädigende Agenzien wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotin, Hyperlipidämie und infektiöse Mikroorganismen (Ross 1999).

In den letzten Jahren fand der Faktor „Inflammation“ (auch im Rahmen einer Autoimmunerkrankung) Eingang in die Diskussion über die Pathogenese der Atherosklerose (Wick, Perschinka et al. 1999). Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigten eine Endotheldysfunktion, welche durch einen entzündungshemmenden  $\text{TNF-}\alpha$ -Blocker (Infliximab) verbessert werden konnte (Hurlimann, Forster et al. 2002). Dies gab Hinweise auf einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen systemischer Inflammation und der endothelialen Dysfunktion bzw. der Atherosklerose. Untermuert wurde diese Annahme durch den Nachweis eines signifikant gesteigerten Risikos für die koronare Herzkrankheit und dem akuten Koronarsyndrom (ACS) bei autoimmunerkrankten Personen (del Rincon, Williams et al. 2001; Asanuma, Oeser et al. 2003; Roman, Shanker et al. 2003; Wolfe, Freundlich et al. 2003). Auch das mittels Aspirationskatheter gewonnene thrombotische Material von Patienten mit ACS wies lokal hochregulierte Werte für Interleukin- (IL-) 6 und Serum-Amyloid-A auf (Maier, Altwegg et al. 2005). Demzufolge präsentiert sich die Atherosklerose auch als eine inflammatorische Erkrankung.

Einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf den Entstehungsprozess der Atherosklerose nimmt - neben den obig genannten sog. klassischen, kardiovaskulären Risikofaktoren (Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Nikotin, Hyperlipidämie) - auch der Faktor „**Stress**“ ein. Gutstein und Mitarbeiter postulierten einen ursächlichen Zusammenhang zwischen Stress und Endothelschädigung und dokumentierten eine stressinduzierte schädigende Wirkung auf das Gefäßsystem (Gutstein 1988).

All jene angeführten Noxen und Risikofaktoren führen zusehends zu einer Beeinträchtigung der vasoprotektiven Eigenschaften des Endothels, wodurch es zur Permeabilitätssteigerung mit Lipoproteineinstrom in die Intima kommt. In den Endothelzellen entsteht aus Fettsäuren durch chemische Reaktionen oxidiertes-LDL (oxLDL), wodurch Entzündungsprozesse stimuliert und Endothelzellen zur Produktion von Chemokinen [monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1)]

---

angeregt werden. Hiermit werden sowohl die Adhäsion von Thrombozyten, als auch die Einwanderung von Monozyten, Lymphozyten und maturer dendritischer Zellen initiiert. Auch fördern Endothelzellen durch die Synthese von Wachstumsfaktoren [monocyte colony stimulating factor (M-CSF)] die Umwandlung von Monozyten zu oxLDL-aufnehmenden Makrophagen (Schaumzellen). In der Folge kommt es zur gesteigerten Sekretion von Zytokinen (IL-1, IL-6, Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ), welche die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media fördern. Jene in die Intima eingewanderten Gefäßmuskelzellen synthetisieren und sezernieren Komponenten der extrazellulären Matrix und führen zur Bildung der fibrösen Plaque (Abb. 2). Mit zunehmender Vulnerabilität und Instabilität der atherosklerotischen Läsion, beispielsweise durch Scherkräfte, lokale Entzündungsreaktionen und matrixabbauende Prozesse, droht die Ulzeration der atheromatösen Plaque. Nach Exposition des subintimalen, thrombogenen Gewebes wird die Bildung eines gefäßverschließenden Thrombus initiiert (van der Wal, Becker et al. 1994; Hansson 2005).

Nachstehende Abbildung 2 skizziert die Pathogenese der Atherosklerose:

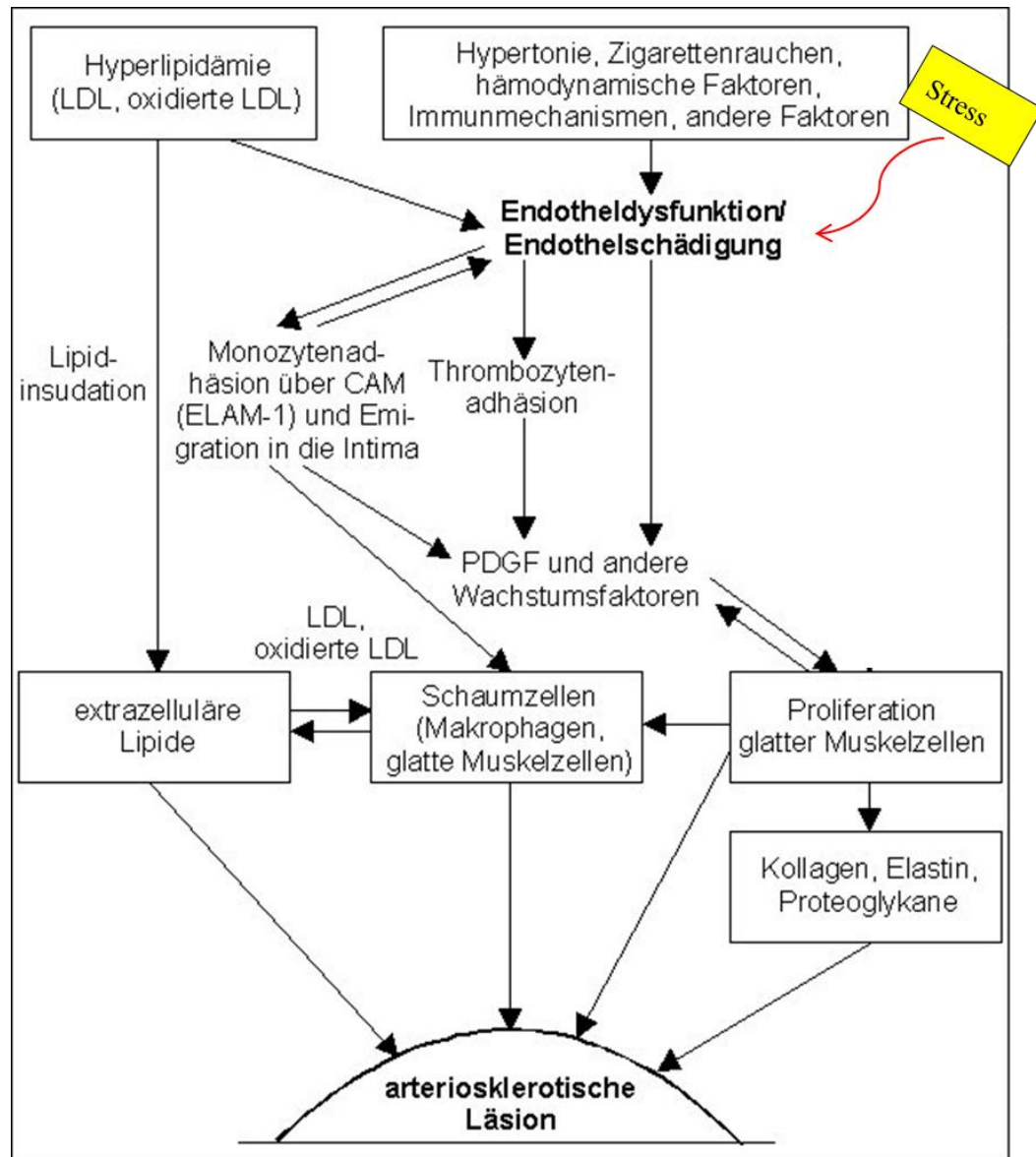


Abb.2 [modifiziert nach (Mencke 1997)]: Pathogenese der Atherosklerose (Response to injury Hypothese): Schädliche Einflüsse wie Hyperlipidämie, Hypertonie, Zigarettenrauchen sowie Stress führen zur Endotheldysfunktion bzw. Endothelschädigung, wodurch die in dieser Abbildung angeführten zellulären Aktivierungen und pathologischen, vaskulären Umbauvorgänge in Gang gesetzt und atherosklerotische Läsionen initiiert werden.

---

Zusammenfassend kann die Atherosklerose als eine entzündlich chronische Gefäßerkrankung betrachtet werden, die durch hochkomplexe multifaktorielle pathologische Prozesse gekennzeichnet ist.

## **1.5 Stress**

Unter physiologischen Bedingungen befindet sich der Organismus in einem ausbalancierten Verhältnis (Homöostase) zwischen metabolischen und neuroendokrinen Regelkreisen. In diesem Gleichgewicht ist der Körper an die gegebenen Umweltbedingungen optimal adaptiert. Stellt sich eine Dysbalance dieser Regelwerke ein, spricht man von Stress (Johnson, Kamilaris et al. 1992).

### **1.5.1 Hauptachsen der Stressreaktion und dessen Hormone**

Die neuroendokrine Stressantwort wird von einem System, welches den Hypothalamus, die Hypophyse, die Nebenniere und das sympathische Nervensystem involviert, gesteuert. Es beinhaltet zwei Teilachsen: die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical-axis*, HPA) und die Hypothalamus-Nebennierenmark-Achse (engl. *sympathetic-adrenal-medullary-axis*, SAM) (Aich, Potter et al. 2009).

#### **1.5.1.1 Die HPA-Achse:**

Physischer und psychischer Stress führen zur Aktivierung komplexer, neuronaler Netzwerke, welche die Ausschüttung von hypothalamischem Cortikotropin-Releasing Hormon (CRH) und in der Folge die Freisetzung von hypophysärem Adrenokortikotropem Hormon (ACTH) bewirken. ACTH induziert die Freisetzung von Cortisol aus der Nebennierenrinde. Negative Rückkoppelungsmechanismen führen über Inaktivierung der übergeordneten, zentralen Steuerzentren zu einer Verminderung von Cortisol, wodurch die Stressantwort beendet wird (Aich, Potter et al. 2009).

#### Exkurs: Cortisol

Cortisol ist das wichtigste Glukokortikoid des menschlichen Körpers. Im Blutplasma wird es durch Kopplung an ein Trägerprotein (Cortisol-bindendes Globulin) zum Zielorgan transportiert.

---

Dort bindet es zytoplasmatische Glukokortikoidrezeptoren. Der Ligand-Rezeptor-Komplex transloziert in den Zellkern und induziert als Transkriptionsfaktor eine gesteigerte Protein *de novo* Synthese zur Adaption an Stress (z.B. Enzyme für die Glukoneogenese). Zudem zeigt Cortisol insulinantagonistische, katabole und lipolytische Eigenschaften, womit Energiesubstrate für eine angemessene Stressantwort zur Verfügung gestellt werden (Mormede and Terenina 2012).

#### Exkurs: CRH

Das bei Stress im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus gebildete CRH vermittelt seine Wirkung über transmembranäre G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Bislang sind zwei CRH-Rezeptor Subtypen identifiziert worden. Der Subtyp R1 wird primär im ZNS (u.a. portales Gefäßnetz der Hypophyse) gebildet, während der Subtyp R2 zusätzlich von peripheren Zellen (Kardiomyozyten, Endothelzellen, Monozyten) exprimiert wird (Simoncini, Apa et al. 1999; Kimura, Takahashi et al. 2002; Wilbert-Lampen, Straube et al. 2006). Auch der Nachweis von peripher synthetisiertem CRH mit autokriner und parakriner Wirkweise untermauert den Verdacht einer ZNS unabhängigen Funktion dieses Hormons (Simoncini, Apa et al. 1999).

### **1.5.1.2 Die SAM-Achse**

Den zweiten wichtigen neurohumoralen Regelkreis in der Stressreaktion stellt die SAM-Achse dar (Aich, Potter et al. 2009). Hierbei wird dem Sympathikus, dessen Aktivität von übergeordneten Zentren (Locus Ceruleus) reguliert wird, eine wichtige Rolle beigemessen. Er initiiert die Ausschüttung von Katecholaminen (Noradrenalin, Adrenalin) aus dem Nebennierenmark, versetzt den Organismus durch eine gesteigerte Bereitstellung von Sauerstoff (Herz-, Atemfrequenz ↑) und freien Fettsäuren und durch Erhöhung der Aufmerksamkeit in eine optimierte Reaktionsbereitschaft und in die Lage schnell und aktiv zu reagieren (fight or flight).

## **1.6 Psychosozialer Stress und Atherosklerose**

Zahlreiche Studien untersuchten die Wirkmechanismen von psychosozialem Stress auf das Herz-Kreislauf-System und dessen Beitrag am Entstehen der Atherosklerose und folgeschwerer Erkrankungen.



---

J. Leor nahm die ungewöhnliche Gegebenheit des sich 1994 ereignenden Erdbebens (*population stressor*) in Kalifornien zum Anlass, den Zusammenhang zwischen psychisch-emotional-akutem Stress und plötzlichem Herztod zu untersuchen. Millionen Menschen wurden am Tag des Erdbebens plötzlich aus dem Schlaf gerissen und einer lebensbedrohlichen Situation ausgesetzt. Es kam - vornehmlich prädisponierte Personen mit bekannter atherosklerotischer Herzerkrankung betreffend - zu einer signifikanten Zunahme plötzlicher Todesfälle von einem täglichen Durchschnitt von 4,6 auf 24 (Leor, Poole et al. 1996).

Am 16. Januar 1991 begann im Zuge des zweiten Golfkriegs die internationale Koalition unter der Führung amerikanischer Streitkräfte mit massiven Luftangriffen auf strategische Ziele im Irak. Beobachtungen zeigten, dass sich die Anzahl akuter Herzinfarkte bei der betroffenen Zivilbevölkerung nach unmittelbarem Beginn des Kampfangriffs im Vergleich zur korrespondierenden Kontrollperiode (Gruppe A vs. Gruppe B) von 7 auf 20 fast verdreifachte (Meisel, Kutz et al. 1991).

Ein angesehenes, internationales Sportereignis, wie beispielsweise eine Fußballweltmeisterschaft kann als weiteres Paradebeispiel für eine akute Belastungssituation herangezogen werden. Unsere Arbeitsgruppe um Wilbert-Lampen konnte demonstrieren, dass die Inzidenz kardialer Notfälle in Deutschland zur Zeit der Fußballweltmeisterschaft 2006 an Spieltagen der deutschen Nationalmannschaft verglichen zu Kontrollperioden um das rund 2,7-fache signifikant zunahm (Wilbert-Lampen, Leistner et al. 2008). Nachstehende Abbildung (Abb.3) gibt einen Überblick über die Anzahl notärztlich behandelter kardialer Ereignisse während der WM (roter Kurvenverlauf). Das Fußballspiel gegen Argentinien mit spannendem Elfmeterschießen bedingte die höchste Anzahl maligner Herzereignisse (Nr.5). Auf „Platz 2“ rangierte das Spiel gegen Italien (Nr.6), welches in der Verlängerung für die deutsche Mannschaft verloren ging.

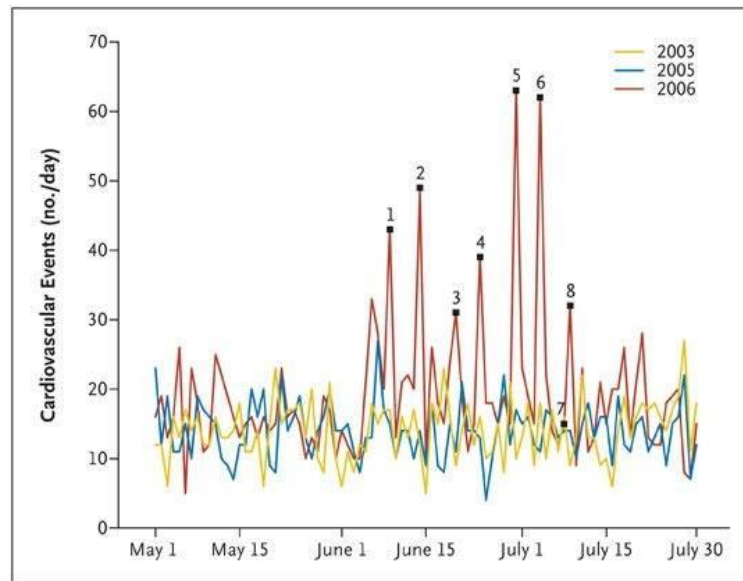


Abb.3 (Wilbert-Lampen, Leistner et al. 2008): Herzinfarktraten der Studienpopulation – aufgezeichnet für das Zeitintervall vom 01.05. bis zum 30.07. für die Jahre 2003, 2005 und 2006; Am 09.06.2006 startete in Deutschland die FIFA Fußballweltmeisterschaft und endete am 09.07.2006; die Nummerierungen im Kurvenverlauf stellen die Spiele mit deutscher Beteiligung dar.

In einer an 30.000 Probanden weltweit durchgeführten Fall-Kontroll-Studie (INTERHEART) wurde gezeigt, dass 30% der akuten Herzinfarkte unabhängig von Geschlecht, Alter und der ethnischen Zugehörigkeit auf psychosozialen Stress zurückzuführen sind (Yusuf, Hawken et al. 2004). Eine eingehendere Analyse der psychosozialen Faktoren dokumentierte, dass sowohl arbeitsplatzbezogener, als auch häuslicher Langzeitstress das Herzinfarktrisiko, verglichen zur Kontrolle, verdoppelte (Odds ratio = 2,14 und 2,12) (Rosengren, Hawken et al. 2004). Auch eine Depression kann als Ausdruck für eine Fehlanpassung stressregulierender Systeme bei psychosozialer, dauerhafter Stresseinwirkung gewertet werden (Otte, Marmar et al. 2004; Otte, Neylan et al. 2005). Belegt durch zahlreiche prospektive Studien stellt eine Depression bei Patienten mit bereits bestehender Herzerkrankung einen unabhängigen kardiovaskulären Risikofaktor dar und führt zu erhöhter Morbidität und Mortalität (Blumenthal, Lett et al. 2003; Carney and Freedland 2003; Whooley, de Jonge et al. 2008).

In Zusammenschau aller uns derzeit vorliegender Studienergebnisse zum Thema Stress kann psychosozialer Stress als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor beschrieben werden (Todaro, Shen et al. 2003; Rosengren, Hawken et al. 2004; Yusuf, Hawken et al. 2004).

---

## 1.7 Endothelin und seine Rezeptoren

Seit Anfang der 1980er Jahre verdichteten sich die Hinweise auf ein bis zu diesem Zeitpunkt noch unbekanntes, von den Endothelzellen beeinflusstes vasodilatatorisches und vasokonstriktorisches System. Von Furchgott 1980 beschrieben, wurden die gefäßerweiternden Effekte durch endothelium-derived relaxing factor (EDRF) vermittelt, hingegen wurde die gefäßverengende Komponente einem hochpotenten Vasokonstriktor - dem Endothelin (ET) - zugeschrieben. 1988 wurde ET erstmals aus aortalen Schweinezellen isoliert und in seiner 21-Aminosäure-fassenden Sequenz dargestellt (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). Es liegt in drei Isoformen ET-1, -2, -3 vor, welche durch den Austausch einiger weniger Aminosäuren voneinander variieren und ein gewebspezifisches Expressionsmuster zeigen. Obwohl jedes ET- Isopeptid grundsätzlich eine Vasokonstriktion bewirken kann, stellt ET-1 im Bereich der kardiovaskulären Physiologie und Pathophysiologie – bedingt durch dessen hochpotente vasokonstringierende Eigenschaft und der gegebenen zentralen Bedeutung in der Regulation des Gefäßtonus (Galie, Manes et al. 2004) - die wohl wichtigste Isoform dar (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Zudem hat es Einfluss auf die Zellproliferation (MacLean 1998) und Hormonproduktion (Levin 1995).

ET-2 wird vor allem in der Niere und vom Gastrointestinaltrakt gebildet, während ET-3 in höheren Konzentrationen im ZNS zu finden ist und dort an neuronalen Proliferations- und Entwicklungsprozessen beteiligt zu sein scheint. Die Wirkung von Endothelin-1 wird im Folgenden (s.u.) angeführt.

Alle Endothelin-Isoformen werden initial aus einem 212-Aminosäure-langem Vorläufermolekül, dem Prepro-Endothelin (ppET), mithilfe einer Endopeptidase und eines Endothelin-Konvertierungsenzyms (ECE) in die biologisch aktive Form konvertiert (Rubanyi and Polokoff 1994; Barton and Yanagisawa 2008).

Nachstehende Abbildung soll den ECE-induzierten katalytischen Prozess – beispielhaft gezeigt am ET-1 – skizzieren.

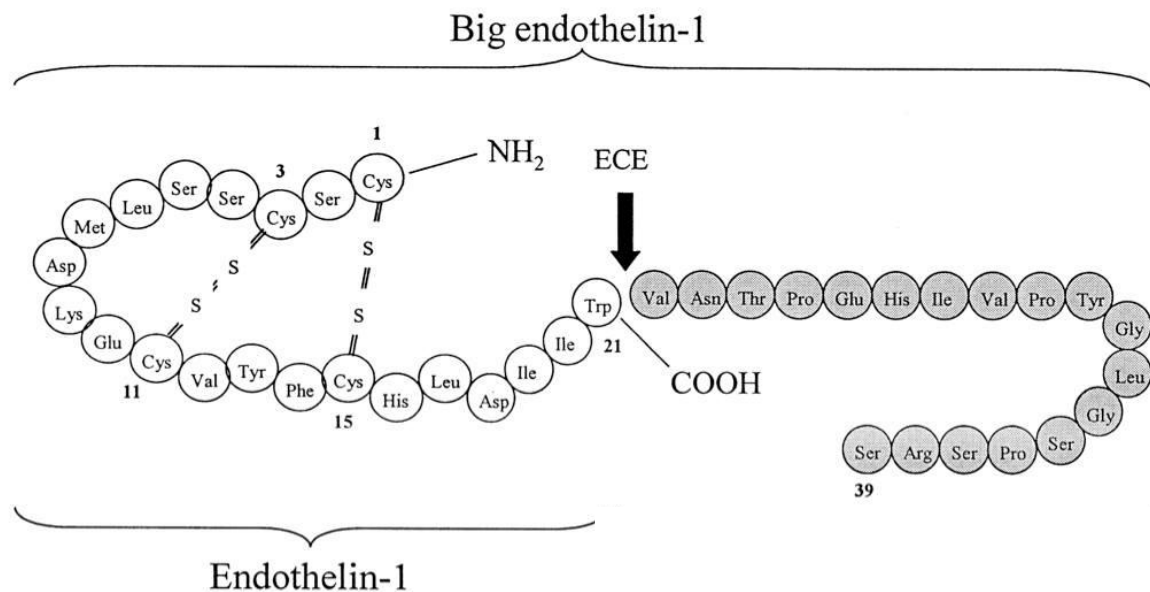


Abb.4 [modifiziert nach (Wanecek, Weitzberg et al. 2000)]: Aminosäuresequenz von Big ET-1 (39 Aminosäuren) und ET-1 (21 Aminosäuren), welches erst nach enzymatischer Hydrolyse durch ECE aus dem Vorläuferpeptid entsteht.

Endotheline wirken über zwei Rezeptoren, den  $ET_A$ - und den  $ET_B$ -Rezeptor ( $ET_A$ -R,  $ET_B$ -R), weisen aber unterschiedliche Rezeptoraffinitäten auf ( $ET-1 > ET-2 \gg ET-3$  für  $ET_A$ -R;  $ET-1 = ET-2 = ET-3$  für  $ET_B$ -R) (Attina, Camidge et al. 2005). Die Klonierung eines dritten Rezeptorsubtyps  $ET_C$  gelang bislang nur in Amphibien (La and Reid 1995). Das Rezeptorverteilungsmuster und deren Relation zueinander sind zell- und gewebsspezifisch. So zeigte sich in sowohl koronaren, pulmonalen und aortalen Gefäßmuskelzellen [vascular smooth muscle cell (VSMC)], als auch in ventrikulären Kardiomyozyten ein deutliches Überwiegen des  $ET_A$ -Rezeptors, hingegen im Reizleitungssystem des Herzens ein Dominieren des  $ET_B$ -Rezeptors (Molenaar, O'Reilly et al. 1993; Davenport, O'Reilly et al. 1995).

Nachstehende Abbildung (Abb.5) skizziert das Grundschemata ET-1-induzierter, intrazellulärer Signaltransduktionswege an Endothel- und Gefäßmuskelzellen:

Das von Endothelzellen gebildete ET-1 bindet an G-Protein-gekoppelte Endothelin-Rezeptoren der VSMC. In der Folge kommt es zur Erhöhung zytosolischer Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ )-Konzentrationen, hierüber zur Entleerung intrazellulärer Calciumspeicher und abschließend zur vasokonstriktorisches Effektvermittlung.

Bei Bindung an den endothelialen ET<sub>B</sub>-Rezeptor resultiert die Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub> (Galie, Manes et al. 2004), welche an der VSMC eine Vasodilatation, sowie eine Verminderung des proliferativen Stimulationsreizes induzieren (Rubanyi and Polokoff 1994).

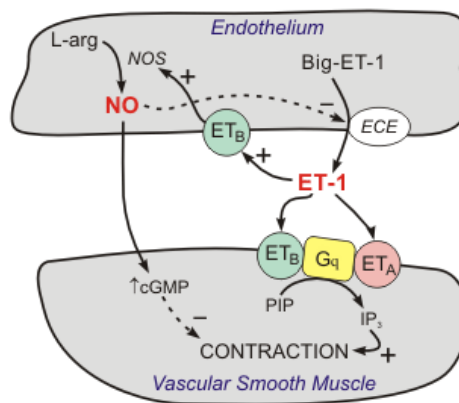


Abb.5: Wirkung und die zugrunde liegenden Wirkmechanismen von ET-1 und NO an der Endothelzelle und der glatten Gefäßmuskelzelle (Klabunde 2007).

## 1.8 Endothelin-1

Endothelin-1 zeigt im menschlichen Organismus das breiteste Expressionsmuster. Es wird - als einzige der drei Isoformen - von Endothelzellen gebildet und zum Großteil (75%) von den in unmittelbarer Nähe befindlichen, abluminal gelegenen Gefäßmuskelzellen via ET-Rezeptor aufgenommen. Hiermit erlangt das ET-1 die Funktion eines parakrinen und weniger eines endokrinen Hormons (Wagner, Christ et al. 1992; Galie, Manes et al. 2004). Auch sind glatte Gefäßmuskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten, Kardiomyozyten (Kaddoura, Firth et al. 1996), Sertoli-Zellen, Epithelzellen der Mamma, Mesangiumzellen der Niere und Astrozyten in der Lage ET-1 zu bilden (Rubanyi and Polokoff 1994).

Stimuliert durch verschiedenste physikalisch-chemische Reize, Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Mediatoren wie beispielsweise Hypoxie (Rakugi, Tabuchi et al. 1990), Ischämie, Schubspannung, Stress/Katecholamine (Levin 1995; Kaddoura, Firth et al. 1996; Nickel, Deutschmann et al. 2009), HDL, oxLDL (Boulanger, Tanner et al. 1992), TNF- $\alpha$ , IL-1, Insulin, Thrombin (Schini, Hendrickson et al. 1989), Angiotensin II (Morey, Razandi et al. 1998), Vasopressin, Testosteron (Polderman, Stehouwer et al. 1993; Wilbert-Lampen, Seliger et al.

2005), epidermaler Wachstumsfaktor, bFGF und Insulin-like growth factor (Luscher 1992; Rubanyi and Polokoff 1994; Galie, Manes et al. 2004; Attina, Camidge et al. 2005) werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und die ET-1- Synthese und Sekretion induziert. Somit scheint eine bedarfsorientierte Syntheseleistung, nicht aber eine intrazelluläre Speicherung des ET-1 in Sekretgranula, vorzuliegen (Galie, Manes et al. 2004). Zu den auf die Biosynthese inhibitorisch wirkenden Substanzen zählen die Vasodilatoren NO und PGI<sub>2</sub>, sowie das ET-3 und das atriale natriuretische Peptid (ANP) (Attina, Camidge et al. 2005).

Die Plasmahalbwertszeit des ET-1 beträgt im menschlichen Organismus 4-7 Minuten (Gray and Webb 1996; Galie, Manes et al. 2004). Neben der pulmonalen Clearance (Levin 1995) dürften beim Menschen vor allem aber intrazelluläre Degradierungs-Enzyme für die Beseitigung des zirkulierenden ET-1 verantwortlich sein. Proteasen der Endothelzellen, der glatten Gefäßmuskelzellen und Thrombozyten wären als Vertreter jener degradierenden Enzyme zu nennen (Gray and Webb 1996). ET-1 vermittelt seine zell- und gewebspezifischen vielfältigen Wirkungen primär via ET<sub>A</sub>-R (s. Abb.5). An der glatten Gefäßmuskelzelle (VSMC) bewirkt ET-1 eine Vasokonstriktion und Proliferation, hat einen chemotaktischen Effekt auf VSMC und fördert deren Migration (Luscher and Barton 2000; Jeremy, Shukla et al. 2011).

An Endothelzellen induziert es die Bildung des Chemokins MCP-1 (monozytär-chemotaktisches Protein-1), welches die aktive, gerichtete Wanderung der im Blut zirkulierenden Monozyten auslöst (Haller, Schaberg et al. 1991). Ferner führt ET-1 an der Endothelzelle zu einer erhöhten Neutrophilenadhäsion (ICAM-1↑, VCAM-1↑), sowie Plättchenaggregation (Ergul, 2002; (Luscher and Barton 2000) mit Entwicklung und Progression atheromatöser Plaques (Abb.6).

Des Weiteren induziert es die Produktion von Wachstumsfaktoren (VEGF, bFGF), stimuliert die Synthese extrazellulärer Matrixproteine durch Fibroblasten, aktiviert den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF-κB in Monozyten (Browatzki, Pfeiffer et al. 2005) und bewirkt eine gesteigerte Zytokinfreisetzung durch Makrophagen.

Zudem initiiert es die Bildung sowohl antagonistischer vasodilatierender Substanzen (NO, PGI<sub>2</sub>, ANP), als auch des synergistisch vasokonstriktorischen Angiotensin II. Auch hemmt es die herzfrequenzsenkende Aktivität der Barorezeptoren, induziert die Aldosteronsynthese in der Nebennierenrinde (Natriurese↓, Diurese↓, GFR↓) und bedingt eine gesteigerte ADH Freisetzung, worüber rückläufig die endotheliale ET-1 Synthese im Sinne eines positiven Rückkoppelungsmechanismus hochreguliert wird. Ebenso potenziert es die Wirkung anderer

gefäßverengender Substanzen wie Noradrenalin und Serotonin. Hierdurch beweist das ET-1 neben seiner direkten vasokonstriktorisches Effekte auch indirekte Einflussnahme auf das Gefäßsystem.

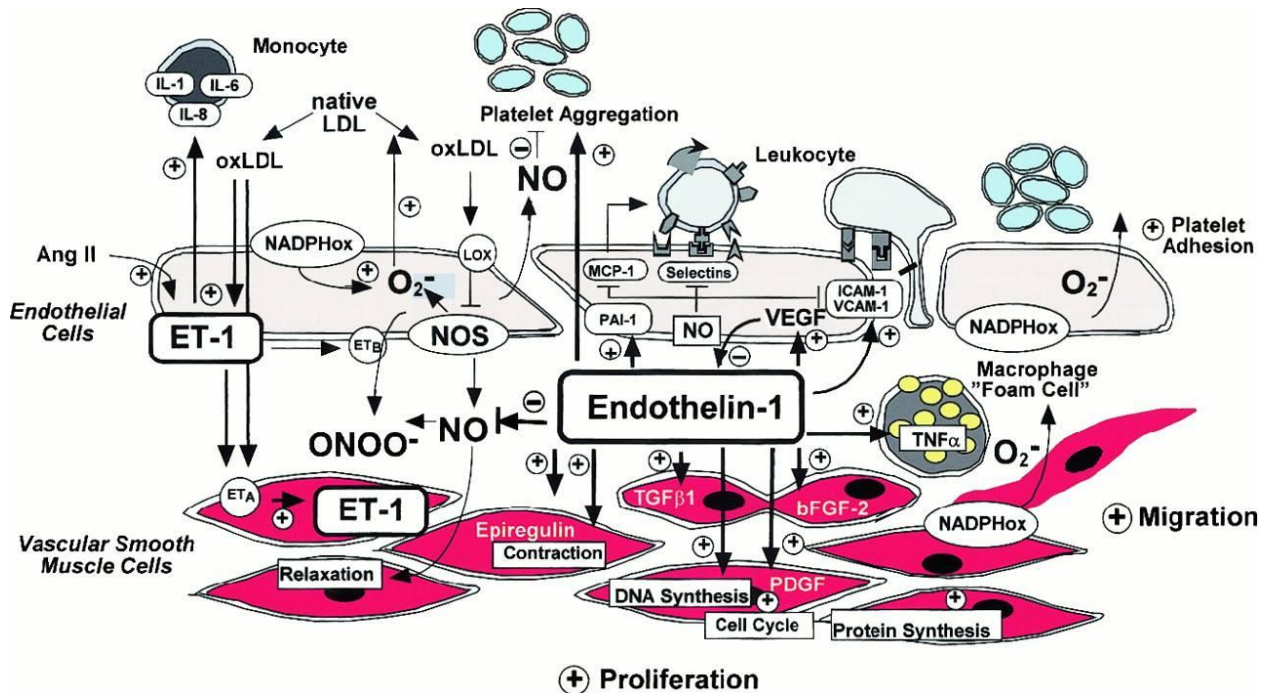


Abb.6 (Luscher and Barton 2000) zeigt die Effekte von ET-1 sowohl an VSMC, als auch an Endothelzellen. Um nur einige der unzähligen Wirkungen zu erwähnen, sei der proliferative, vasokonstriktorisches Effekt, sowie die ET-1-induzierte Migration der VSMC erwähnt. An der Endothelzelle beispielsweise führt ET-1 zur Bildung von NO, VEGF, sowie zur Induktion der Expression von ICAM-1 und VCAM-1.

NO = Stickstoffmonoxid; VEGF = Vascular Endothelium Growth Factor; ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1; VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule-1

Geschlechtsspezifische Differenzen in der basalen Plasma-ET-1 Konzentration konnten nachgewiesen werden. So zeigte das männliche Geschlecht höhere Basalspiegel als das weibliche (Miyauchi, Yanagisawa et al. 1992; Polderman, Stehouwer et al. 1993; Treiber, Kapuku et al. 2002). In der Folge ist von einem sensiblen Zusammenspiel verschiedener, sich wechselseitig simulierender oder inhibierender Hormonsysteme, auszugehen (Morey, Razandi et al. 1998).

---

### 1.8.1 Endothelin-1 assoziierte kardiovaskuläre Pathologien

#### Endothelin-1 und koronare Herzerkrankung

Aufgrund seiner hochpotenten vasokonstriktorisches, proliferativen, thrombogenen Eigenschaft und seiner beachtlichen Beteiligung an inflammatorischen Prozessen (Browatzki, Pfeiffer et al. 2005) kann ET-1 als pro-atherogene Substanz bezeichnet werden (Lerman, Holmes et al. 1995). Auch infolge seiner wesentlichen Einflussnahme im Entstehungsprozess der endothelialen Dysfunktion und deren Folgeschäden wird dem ET-1 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beigemessen (Davignon and Ganz 2004). Lerman et al. dokumentierten erhöhte ET-1 Plasmakonzentrationen bei Patienten mit bekannter peripherer, aortaler, renaler, koronarer atherosklerotischer Gefäßveränderung im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv (Lerman, Edwards et al. 1991). Zudem zeigten Untersuchungen an Patienten bei Z.n. Myokardinfarkt (Miyauchi, Yanagisawa et al. 1989; Yasuda, Kohno et al. 1990; Stewart, Kubac et al. 1991) und mit kardiogenem Schock (Stewart, Kubac et al. 1991; Tomoda 1993) erhöhte ET-1 Plasmawerte. Stewart et al. berichteten von einem signifikanten Anstieg der ET-1 Plasmakonzentration unmittelbar nach Myokardinfarkt mit einem Maximum nach bereits 6 Stunden (Stewart, Kubac et al. 1991). Ferner scheint eine signifikant positive Korrelation zwischen der ET-1 Plasmakonzentration drei Tage *post* Myokardinfarkt und der 1-Jahresmortalität zu bestehen (Omeland, Lie et al. 1994). Auch konnten erhöhte Werte von ET-1 in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden (Zeiber, Goebel et al. 1995). Vermutlich aktiviert das in den Atheromen akkumulierende oxLDL Makrophagen und Endothelzellen zur gesteigerten Synthese und Freisetzung von ET-1 (Martin-Nizard, Houssaini et al. 1991), worin u.a. die Ursache der von Zeiber et al. erhöht gemessenen ET-1 Werte liegen könnte. Des Weiteren fand der Nachweis erhöhter ECE-1 Konzentrationen in atherosklerotisch veränderten Koronararterien statt (Minamino, Kurihara et al. 1997). Hingegen wurde bei Antagonisierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors eine Verzögerung der Atherogenese beobachtet (Barton 2000; Luscher and Barton 2000).

In einer tierexperimentellen Studie konnte durch die Gabe des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123 die Herzinfarktgröße um 40% reduziert werden (Grover, Dzwonczyk et al. 1993; Kedzierski and Yanagisawa 2001). Auch dürfte ET-1 an der Neointimabildung und Restenosierung nach Ballondilatation (PTCA) erheblich beteiligt sein. Demnach kam es nach Ballonangioplastie der A.carotis an Rattenmodellen zu einer signifikant erhöhten



---

Genexpressionen von ET-1, ECE, sowie beider (ET<sub>A</sub>-R, ET<sub>B</sub>-R) Rezeptoren (Wang, Douglas et al. 1996). Die Gabe eines unselektiven Rezeptorantagonisten schwächte die proliferativen Effekte des Endothelins auf VSMC in einem Rattenmodell nach Ballonangioplastie wirksam ab (Tsujino, Hirata et al. 1995), hingegen verstärkte die Applikation von ET-1 den hyperplastischen Wachstumsreiz (Douglas and Ohlstein 1993). Auch der Nachweis einer gesteigerten Expression von ET-1 und des ET<sub>A</sub>-Rezeptors in humanen Venentransplantaten weisen auf das mitogene Potential des Endothelin-Systems hin (Jeremy, Shukla et al. 2011). Ferner belegte eine klinische Studie den nicht unwesentlichen Einfluss von ET-1 als vasokonstriktorisches Komponente bei Transplantatvaskulopathie (Larose, Behrendt et al. 2009). Nach Applikation von BQ-123 wiesen initial verengte Koronargefäße bei Z.n. Transplantation eine vermehrte Vasodilatation von ca. 8% auf (Larose, Behrendt et al. 2009). Autopsisch untersuchte Koronararterien von an Myokardinfarkt verstorbenen Personen exprimierten signifikant sowohl eine erhöhte mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors, als auch des ET<sub>B</sub>-Rezeptors verglichen mit dem Kontrollkollektiv (Wackenfors, Emilson et al. 2004). Patienten mit Aortenklappenstenose, deren Pathologie Ähnlichkeiten zur Atherosklerose aufweist, zeigten lokal an den kalzifizierten veränderten Klappensegeln eine Hochregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors (Peltonen, Taskinen et al. 2009).

### **Endothelin-1 und Herzinsuffizienz**

Bei chronisch herzinsuffizienten Patienten konnten zwei bis dreifach erhöhte big-ET-1 und ET-1 Plasmakonzentrationen (Zolk, Quattek et al. 1999), die mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelierten und als prognostisch bedeutsame Marker identifiziert wurden, gemessen werden. Auch gelang der Nachweis einer signifikant gesteigerten ET<sub>A</sub>-R Expression in linksventrikulärem Gewebe bei chronischer Herzinsuffizienz (Asano, Bohlmeier et al. 2002).

In tierexperimentellen Modellen wurde beispielsweise durch Langzeitbehandlung mit dem selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123 eine Verbesserung der hämodynamischen Kenngrößen (Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen, sowie des rechtsventrikulären systolischen Druckes), sowie eine Verminderung des kardialen Remodelings erzielt (Sakai, Miyauchi et al. 1996; Remuzzi, Perico et al. 2002).

### **Endothelin-1 und weitere damit assoziierte Erkrankungen**

Zudem scheint ET-1 metabolisch-hormonelle Veränderungen zu induzieren (Adipositas, Diabetes mellitus), bei der Entstehung maligner und benigner Erkrankungen involviert (Wang and Dashwood 2011; Tanfin and Breuiller-Fouche 2012) und über Aktivierung mechano-sensitiver Nozizeptoren an der Schmerzentstehung beteiligt zu sein (Namer, Hilliges et al. 2008).

### 1.8.2 Pharmakotherapie des Endothelin-Systems

Nachstehende Tabelle 1 soll die wichtigsten *in vivo* Effekte des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123 zusammenfassen, zumal die Wirkung dieser Substanz auch in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer veränderten ET<sub>A</sub>-R Expression auf Genebene Gegenstand der Untersuchungen war. Tabelle 2 [modifiziert nach (Remuzzi, Perico et al. 2002)] soll einen Überblick über einige der bislang erprobten bzw. zugelassenen ET-Rezeptorantagonisten schaffen:

Tabelle 1      **Effekte des ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123**

Antagonist	Zielstruktur	Wirkung
BQ-123	ET <sub>A</sub> -R	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Verbesserung der endothelialen Dysfunktion und Atherosklerose (Halcox, Nour et al. 2001)</li> <li>• Verhinderung stressinduzierter Vasokonstriktion (Spieker, Hurlimann et al. 2002)</li> <li>• Steigerung der Koronarreserve (Papadogeorgos, Bengtsson et al. 2009)</li> <li>• Reduktion des ventrikulären Remodelings (Remuzzi, Perico et al. 2002)</li> <li>• Verbesserung linksventrikulärer Funktionsparameter (Adlbrecht, Andreas et al. 2012)</li> </ul>

Tabelle 2      **Erprobte ET-Rezeptorantagonisten in klinischen Studien**

Antagonist	Zielstruktur	(mögliche) Indikation
Bosentan	ET <sub>A</sub> -R, ET <sub>B</sub> -R	PH

---

Ambrisentan	ET <sub>A</sub> -R	PH
Atrasentan	ET <sub>A</sub> -R	Prostata CA in Kombination mit Docetaxel (Wang and Dashwood 2011)
Sitaxsentan	ET <sub>A</sub> -R	PH
Darusentan	ET <sub>A</sub> -R	abgebrochen aufgrund UAW
Enrasentan	ET <sub>A</sub> -R	abgebrochen aufgrund UAW

PH = pulmonale Hypertonie

UAW = unerwünschte Arzneimittelwirkung

Nach Entdeckung der gewebeabhängigen Expression der Endothelinrezeptorsubtypen und der Beobachtung der nicht unwesentlichen Beteiligung des vasopressorischen Endothelin-Systems an der Pathophysiologie kardiovaskulärer und -pulmonaler Erkrankungen sollte die Blockade des signalvermittelten ET<sub>A</sub>-Rezeptors ein wichtiges Target in der Behandlung ET-1 assoziierter Erkrankungen darstellen.

So wurde Bosentan, ein dualer ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptorantagonist, im Jahre 2002 durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zur Senkung des pulmonalarteriellen Druckes sowie zur Verbesserung der Symptomatik bei *pulmonaler Hypertonie* (PH) zugelassen. 2008 folgte die Bewilligung des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten Ambrisentan. Auch Sitaxentan aus der Gruppe der selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten wurde zur Behandlung der PH entwickelt. Aufgrund schwerwiegender Leberschädigungen wurde dieses Pharmakon 2010 in Deutschland vom Markt genommen.

Im Vergleich hierzu wurde bis dato noch keine Zulassung von Endothelinrezeptorantagonisten zur Behandlung der *Herzinsuffizienz* erteilt. Trotz zahlreicher, vielversprechender *in vitro* und tierexperimenteller Studienergebnisse (s.1.8.1) mit nachweisbar verbesserten neurohumoralen und hämodynamischen Parametern unter dem Einfluss von Endothelinrezeptorantagonisten, blieb bislang der Nachweis eines signifikanten Absinkens der Morbidität und Mortalität bei herzinsuffizienten Patienten aus: Einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten, randomisierten Pilotstudie (REACH-Studie) nach zu urteilen, würde eine längerfristige, niedrig dosierte Bosentan Therapie bei Patienten mit höhergradiger Herzinsuffizienz eine positive Wirkung auf

Symptomatik und Hämodynamik haben. Aufgrund der sich verschlechterten Leberfunktionsparameter musste die Studie aber frühzeitig abgebrochen werden (Mylona and Cleland 1999).

Auch in einer Langzeit-Studie (ENABLE) verlief die klinische Untersuchung mit dem unselektiven Rezeptorantagonisten Bosentan enttäuschend: es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für eine kardiale Dekompensation und Hospitalisation, bedingt u.a. durch eine Steigerung der Natrium-und Wasserretention (Remuzzi, Perico et al. 2002).

Eine aktuellere doppelblinde, randomisierte Fall-Kontrollstudie (EARTH) untersuchte den Effekt des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten Darusentan bei optimal medikamentös eingestellten Patienten mit moderater bis schwerer Herzinsuffizienz im Vergleich zur Placebogruppe. Es ergab sich kein signifikant vorteilhaftes Ergebnis gegenüber der Kontrollgruppe (Kirchengast and Luz 2005).

## 1.9 Stress und Endothelin-1

Bislang wurde in dieser Arbeit der relevante Zusammenhang zwischen emotional-psychosozialem Stress und Atherosklerose exemplarisch dargestellt (Leor, Poole et al. 1996; Wilbert-Lampen, Leistner et al. 2008) und auf die Wichtigkeit des Stresses als Auslöser akuter koronarer Ereignisse hingewiesen (Rozanski, Blumenthal et al. 1999). Die hierfür verantwortlichen Pathomechanismen sind durch Aktivierung verschiedenster hormoneller Regelkreise (HPA-Achse, SAM-Achse, RAAS, Geschlechtshormonachse) und deren wechselseitige Interaktion hochkomplex. Dem Endothelin-System kann aber eine immer wichtigere Rolle in stressinduzierten kardiovaskulären Prozessen (endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose, ACS) beigemessen werden:

Wilbert-Lampen et al. gelangen in einem *in vitro* Experiment mit humanen koronaren Endothelzellen der Nachweis einer CRH-induzierten Modifikation des Endothelin-Systems. CRH führte zeit- und konzentrationsabhängig signifikant zu einer Zunahme der ET-1 Konzentration (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006).

Angelehnt an diese Vorarbeit (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006) wurde der Einfluss von sowohl akuten (Noradrenalin, Adrenalin) als auch chronischen (Dexamethason,  $\beta$ -Endorphin, CRH) Stresshormonen an humanen mikrovaskulären Endothelzellen im Hinblick auf ein stressinduziertes, verändertes Endothelin-System untersucht. Es wurde unter allen

Stresshormonen signifikant eine Zunahme der Freisetzung von ET-1 dokumentiert. Auch konnte eine Hochregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Proteinebene nachgewiesen werden (Nickel, Deutschmann et al. 2009).

Ferner zeigte die im Rahmen der Fußballweltmeisterschaft durchgeführte klinische Studie von Wilbert-Lampen et al. (Wilbert-Lampen, Nickel et al. 2010), dass Patienten mit Myokardinfarkt und gleichzeitiger emotionaler Belastung (Verfolgen eines Fußballspiels mit Beteiligung der deutschen Nationalmannschaft) signifikant höhere ET-1 Plasmakonzentrationen zeigten, als die Kontrollgruppe (Myokardinfarkt ohne Stresseinwirkung). Aufgrund der in beiden Vergleichsgruppen zugrundeliegenden ischämischen Stoffwechsellage wird der Faktor Stress zum einzigen Differenzierungsmerkmal zwischen beiden Gruppen und hierdurch dessen weitreichender Einfluss auf das Endothelin-System erkennbar. ET-1 könnte folglich als Marker für stressinduzierte, akute kardiale Ereignisse bezeichnet werden.

Auch die Ergebnisse der klinischen Studie um Spieker et al. unterstreichen die Bedeutung des Zusammenhangs zwischen Stress und dem Endothelin-System: eine kurzzeitige, emotionale Stressbelastung induzierte eine längerfristige Abnahme der flussvermittelten-endothelabhängigen-Vasodilatation, hinweisend auf eine stressinduzierte endotheliale Dysfunktion (NO↓, ET-1↑). Hingegen führte die gleichzeitige Verabreichung des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123 zu einer Aufhebung der verminderten Vasodilatation (Spieker, Hurlimann et al. 2002). Hierdurch scheint die (ET-1-vermittelte) Aktivierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors mitunter ein wichtiger, initiiender Mechanismus für das Entstehen der Endotheldysfunktion zu sein.

## 1.10 Sexualhormone

Untersucht man die geschlechterspezifische Tendenz in der Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen, erkennt man, dass Männer bis zu einem Alter von etwa 50 Jahren deutlich früher an der KHK erkranken, als Frauen in korrespondierenden Altersgruppen (Kannel and Belanger 1991). Postmenopausal steigt allerdings die Zahl der betroffenen Frauen sprunghaft an (Kannel, Hjortland et al. 1976). Dieses Phänomen bringt vermutlich die altersbedingten Veränderungen des Hormonhaushalts des weiblichen Sexualhormons Östrogen, welches vasoprotektive, anti-inflammatorische, anti-atherogene Eigenschaften (NO↑, ET-1↓) aufzuweisen scheint, zum Ausdruck (Nathan and Chaudhuri 1997; Akishita, Kozaki et al. 1998; Mendelsohn and Karas

2005). Demnach dürfte auch eine zum richtigen Zeitpunkt begonnene postmenopausale Hormonersatztherapie (= Timing Hypothese) – abhängig vom Alter, sowie zeitlichem Abstand zur Menopause – protektive Wirkungen auf das Gefäßsystem haben (Mendelsohn and Karas 2005; Hodis, Collins et al. 2012).

Im Folgenden soll ein Überblick über die Geschlechtshormon-induzierten Wirkungen auf das kardiovaskuläre System und deren modifizierender Einfluss auf das Endothelin-System geschaffen werden.

### **1.10.1 Darstellung genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen von $\beta$ -Östradiol:**

#### **1.10.1.1 Signalwege via Östrogenrezeptor (ER)**

Bekanntlich verfügt das wichtigste weibliche Sexualhormon Östrogen aus der Klasse der Steroidhormone über sowohl schnelle nicht-genomische, als auch über langanhaltende genomische Effekte.

Zu den Kurzzeiteffekten zählen antioxidative Mechanismen und die gesteigerte Synthese von NO mit konsekutiver rascher Gefäßrelaxation (Shaul 2000). Auch hebt Östrogen vermutlich über Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration (Mendelsohn and Karas 1994) die vasokonstriktorisches und proliferativen Wirkungen des Endothelins an glatten Gefäßmuskulzellen und Kardiomyozyten auf (Nuedling, Kahlert et al. 1999). Ein **membranständiger** ER soll hierfür verantwortlich sein (Falkenstein, Tillmann et al. 2000; Orshal and Khalil 2004).

Die langanhaltende Wirkung des Östrogens (Lipidmetabolismus: HDL $\uparrow$ ) unterliegt der **klassischen** Östrogen/Östrogenrezeptor-vermittelten **transkriptionellen** Regulation mit Hoch- bzw. Herunterregulierung verschiedenster östrogenempfindlicher Gene (Mendelsohn and Karas 1994; Weiner, Lizasoain et al. 1994; Sullivan, Karas et al. 1995).

---

### 1.10.1.2 Alternative ER-unabhängige Signalwege:

Neben der klassischen ER-vermittelten (Akishita, Kozaki et al. 1998) Signalgebung müssen auch ER-unabhängige, alternative Signalwege in Betracht gezogen werden: im atherogenen Maus-Modell wurde nach Östrogenapplikation eine Verhinderung der neointimalen Hyperplasie beobachtet, obwohl die Tiere keinen funktionsfähigen ER exprimierten (Iafrati, Karas et al. 1997). Dieser Effekt könnte auf eine Östrogen-induzierte Aktivierung des Sigma-1-Cocain-Rezeptors, welcher nachweislich *in vitro* von Endothelzellen exprimiert wird, zurückgeführt werden (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005).

### 1.10.2 Darstellung genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen von Testosteron

Testosteron entfaltet seine genomische Wirkung klassischerweise über einen **nukleären** Androgenrezeptor. Aufgrund einer schnellen Testosteron-vermittelten Vasodilatation muss auch eine nicht-genomische Regulierung angenommen werden. Möglicherweise induziert Testosteron die Aktivierung von Kaliumkanälen (Deenadayalu, White et al. 2001) und/oder führt zur Blockade von Kalziumkanälen (Hall, Jones et al. 2006).

### 1.10.3 Einfluss der Aromatisierung

Nachdem in Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen der Nachweis des Enzyms Aromatase, welches die Konversion von Testosteron zu Östradiol katalysiert, gelang, wurde bald klar, dass das weibliche Sexualhormon, lokal innerhalb der arteriellen Gefäßwand, aus zirkulierenden Vorläuferhormonen gebildet werden kann (Wu and von Eckardstein 2003).

### 1.10.4 Geschlechtsspezifischer Einfluss auf das Endothelin-System

Zahlreiche *in vitro* Experimente zeigten unter dem Einfluss von  $\beta$ -Östradiol signifikant eine Reduktion der ET-1 Genexpression (Bilsel, Moini et al. 2000), eine reduzierte *basale*

---

Freisetzung von ET-1 humaner koronarer Endothelzellen (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005) und von humanen Endothelzellen umbilikanen Ursprungs (Bilsel, Moini et al. 2000), sowie eine reduzierte ET-1 Sekretion in *Co-Stimulations*versuchen mit beispielsweise TNF- $\alpha$ , Thrombin, Angiotensin II oder Serum (Wingrove and Stevenson 1997; Akishita, Kozaki et al. 1998; Morey, Razandi et al. 1998; Bilsel, Moini et al. 2000; Dubey, Jackson et al. 2001).

*In vivo* erbrachte die Behandlung postmenopausaler Frauen mit Östrogenen eine Abnahme der ET-1 Plasmakonzentration im Vergleich zur Placebogruppe (Ylikorkala, Orpana et al. 1995; Haenggi, Bersinger et al. 1999; Anwaar, Rendell et al. 2000). Zudem führte eine kurzzeitige, 20 minütige, intrakoronare Östradiol-Infusion bei postmenopausalen Frauen mit koronarer Herzkrankheit zu einer reduzierten, im Koronarsinus gemessenen, ET-1 Plasmakonzentration (Webb, Ghatei et al. 2000).

*Vice versa* wurde an aortalen Endothelzellen ovariectomierter Schweine eine signifikant hochregulierte mRNA des Vorläuferproteins ppET-1 beobachtet (Wang, Barber et al. 1997).

Wang et al. zeichneten an aortalen Gefäßmuskelzellen von Ratten eine  $\beta$ -Östradiol-induzierte Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene auf (Wang, Tan et al. 2001).

Testosteron hingegen induzierte signifikant eine gesteigerte Synthese und Freisetzung von ET-1 an kultivierten koronaren Endothelzellen (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005). Analog hierzu beschrieben Polderman et al. signifikant höhere ET-1 Plasmakonzentrationen bei Männern als bei Frauen (Polderman, Stehouwer et al. 1993). Zudem wiesen Männer im Vergleich zu Frauen sowohl vor als auch nach Stresstestung (Videospiele, cold-pressure-test) signifikant höhere ET-1 Plasmakonzentrationen auf.

Auch wurde an aortalen und mesenterialen, arteriellen Gefäßen von männlichen Ratten eine erhöhte Expression der ET-1 mRNA bei gleichzeitig reduzierter ET<sub>A</sub>-R Genexpression beobachtet (David, Montezano et al. 2002).

Neben der soeben angeführten direkten Wirkungen der Sexualhormone auf das Endothelin-System, konnten weitere Studien einen indirekten Einfluss der Geschlechtshormone auf das Gefäßsystem (Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation) nachweisen (Ba, Lu et al. 2007). So zeigte eine tierexperimentelle Studie, dass der Mangel des weiblichen Geschlechtshormons nach



---

Ovarektomie, im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe mit erhaltener ovarieller Aktivität, zu einer ausgeprägteren Vasokonstriktion führte (Orshal and Khalil 2004).

---

### 1.11 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Primäres Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Stress auf das hochpotente vasokonstringierende Endothelin-System im Hinblick auf eine modifizierte Endothelin<sub>A</sub> Rezeptor Genexpression zu untersuchen. Zudem wurde eine mögliche Beeinflussbarkeit durch Sexualhormone analysiert.

Hierzu wurde in einem *in vitro* Experiment der Einfluss der etablierten Stresshormone Cortisol, Cortikotropes-Releasing Hormon und Noradrenalin sowie der Geschlechtshormone  $\beta$ -Östradiol und Testosteron auf humane mikrovaskuläre Endothelzellen untersucht.

Des Weiteren wurde überprüft, ob eine Modifikation des ET<sub>A</sub>-Rezeptors unter der Stimulation mit einem selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten (BQ-123) sowie einem Endothelin-Konversionsenzym-Inhibitor möglich ist.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Haben die Stresshormone Cortisol, CRH und Noradrenalin Einfluss auf die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors humaner mikrovaskulärer Endothelzellen? Gibt es einen zeitabhängigen Effekt?
- Führen die Geschlechtshormone  $\beta$ -Östradiol und Testosteron zu einer veränderten Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Genebene?
- Wie verändert sich die mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Genebene bei gleichzeitiger Stress- und Geschlechtshormonstimulation? Inwiefern kann die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Stimulanzen auf die Zellkultur die Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors beeinflussen?
- Inwiefern zeigen BQ-123 und der Inhibitor des Endothelin-Konversionsenzym modifizierende Effekte auf die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors humaner mikrovaskulärer Endothelzellen? Zeigt sich ein zeitabhängiger Effekt?

## 2. MATERIAL

### 2.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Centrifuge 5804	Eppendorf, Deutschland
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Deutschland
Air Flow SterilGARD III Advance	The Baker Company
Konfokales Mikroskop Axiovert 25	Zeiss LSM 5, Deutschland
ABI PRISMTM 7700	Applied Biosystems, Deutschland
Photometer	Eppendorf, Deutschland

### 2.2 Labormaterial

Material	Hersteller	Katalognummer
Falcon-Röhrchen 50 ml	BD Biosciences, Deutschland	352070
Falcon-Röhrchen 15 ml	Sarstedt AG, Deutschland	20003468
TC-Flasche T 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG, Deutschland	831813002
TC-Flasche T 12,5 cm <sup>2</sup>	Sarstedt AG, Deutschland	353107

### 2.3 Kulturmedium und Zusätze

Kulturmedium und Zusätze	Hersteller	Katalognummer
MCDB 131 ohne Phenolrot ohne L-Glutamin	C.C.PRO GmbH, Deutschland	FM-70-L
Endothelial Cell Growth Supplement (ECGS)	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland	E 2759
FCS	Biochrom AG Berlin, D	S 0125
Epidermal Growth Factor (EGF)	PromoKine, Frankreich	C 60170
L-Glutamin	Biochrom AG Berlin, D	K 0283

---

Hydrokortison	Sigma-Aldrich GmbH, D	H 0888
BSA	Simga-Aldrich GmbH, D	A 7030

## 2.4 Stimulanzen

Stimulans	Hersteller	Katalognummer
CRH	Biotrend Chemicals AG, USA	BP0084
Cortisol	Sigma-Aldrich GmbH, D	C 2755
Noradrenalin	Sigma-Aldrich GmbH, D	A 7257
β-Östradiol	Sigma-Aldrich GmbH, D	E 2758
Testosteron	Sigma-Aldrich GmbH, D	T 1500
BQ-123	Sigma-Aldrich GmbH, D	B 150
ECE Inhibitor	Tocris Bioscience, UK	2512

## 2.5 Sonstiges

Sonstiges	Hersteller	Katalognummer
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden, D	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D	74104
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden, D	205113
SYBR Green Super Mix	BioRad, D	170 8880
Ethanol	Mercle GmbH	1.00986.1000
Trypsin/EDTA	Biochrom AG Berlin, D	L 2143
PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG Berlin, D	L 1820

### 3. Methoden

#### 3.1 Kultivierung und Passage von HMEC (humane mikrovaskuläre Endothelzelle)

##### Kultivierung:

Für die Untersuchung der Modifikation der ET<sub>A</sub>-R Expression unter dem Einfluss von Stress- und Geschlechtshormonen sowie einem ET<sub>A</sub>-R Antagonisten (BQ-123) und dem Inhibitor des Endothelin-Konversionsenzyms (ECE-I) wurde eine etablierte, immortalisierte Endothelzelllinie, die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (HMEC), verwendet. Die Zellen wurden in Nährmedium (MCDB 131), welches mit 10 %-igem fetalem Kalbserum, 2 mM L-Glutamin, 1 µg/ml Hydrokortison und 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor ergänzt wurde, bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in 75 ml Zellkulturflaschen kultiviert. Drei Mal wöchentlich wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und bei konfluentem Zellwachstum die Zellkultur passagiert.

##### Passagieren:

Nach Verwerfen des Überstands der Zellkulturflasche wurden die am Flaschenboden adhärenen Zellen mit 5-10 ml PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen und nachfolgend mittels 3 ml Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Nach ca. 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 5 ml Medium hinzugefügt, um die Trypsinwirkung wieder anzuhalten. Anschließend wurde das Trypsin-Medium-Gemisch in einem 15ml Falcon fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und abschließend im gewünschten Verhältnis in einer neuen Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium ausgesät.

Regelmäßig wurde das Zellwachstum und die Zellvitalität unter dem Lichtmikroskop überwacht. Auch fand in regelmäßigem Abstand ein Mykoplasmentest statt.

Die Zellen waren bis maximal zur 15. Passage in Verwendung.

##### Zellzählung:

Minimale Mengen der Zellsuspension wurden in eine Neubauer Zählkammer überführt. Anschließend wurden die lebenden Zellen der äußeren vier Felder (jeweils aus 16

Kleinquadraten bestehend) ausgezählt. Mittels nachstehender Formel wurde die Zellzahl/ml berechnet:  $\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der ausgezählten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 / \text{Volumen}$

### **3.2 Versuchsvorbereitung und Durchführung der Stimulationen**

Je 400 000 HMEC wurden in Zellkulturflaschen (T 12,5 cm<sup>2</sup>) ausgesät und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert. Für die Einzelstimulationsversuche wurden dem Zellkulturmedium die Testsubstanzen (Cortisol 360 ng/ml, CRH 1 µg/ml, Noradrenalin 10 µg/ml, Testosteron 29 ng/ml, β-Östradiol 27 ng/ml, BQ-123 610 ng/ml, ECE-I 349 µg/ml) jeweils separat hinzugefügt. Unstimulierte Zellkulturen wurden als Kontrolle mitgeführt. In den Co-Stimulationsversuchen (Stresshormone + Geschlechtshormone) fand die Zugabe des zweiten Stimulans erst nach 30 Minuten statt. Auch hier dienten unstimulierte Zellkulturen als Kontrolle.

Nach 6-, 24- und 48-stündiger Inkubation wurde nach bereits obig beschriebenen, in unserem Labor etablierten Verfahren (Überstand abpipettieren, Waschen der Zellen, Hinzufügen von Trypsin, Zentrifugieren) das Zellpellet für nachstehende Arbeitsschritte gewonnen.

### **3.3 Isolierung der RNA aus HMEC und Herstellung von cDNA durch reverse Transkription**

Gemäß den Angaben des Herstellers des RNA-Isolierungskits wurde das Zellpellet lysiert und RNA isoliert. Das RNase-Free DNase Set wurde nach Herstellerangaben verwendet, um reine RNA zu erhalten.

Die Ausbeute und Reinheit der RNA wurde durch spektralphotometrische Dichtemessungen bei 260nm (optische Dichte OD<sub>260</sub>) ermittelt. Auch wurde die OD<sub>280</sub> berechnet und der Quotient aus OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> (OD<sub>260</sub>/280) bestimmt. Anhand der Berechnung des Quotienten kann eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA getroffen werden.

Bei sehr reinen RNA-Lösungen liegt der Quotient zwischen 1,9 und 2,0. Das Enzym Reverse Transkriptase - eine RNA-abhängige DNA Polymerase - katalysiert die Umschreibung von mRNA in cDNA. Die cDNA Synthese wurde mittels Omniscript Reverse Transcription gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden u.a. ein Mastermix mit den in Tab.3 angeführten Substanzen hergestellt und 1 µg denaturierter RNA als Template verwendet.

<i>Master mix</i>	<i>Volume/reaction</i>	<i>Final concentration</i>
10x Buffer RT	2µl	1x
dNTP Mix	2µl	0,5mM pro dNTP
Oligo dT primer (µM)	2µl	1µM
RNase Inhibitor (10 U/µl)	1µl	10U
Omniscript RT	1µl	4U

Tabelle 3: Komponenten des Mastermixes für die Herstellung von cDNA

Anschließend wurde der gesamte Ansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. In der Folge wurde die Reaktion bei 70°C (15 Minuten) beendet. Die cDNA wurde mittels Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O bidest auf 100 µl verdünnt und bis zur PCR bei -20°C gefroren. 1 µl cDNA wurde für die anschließende PCR-Reaktion verwendet.

### 3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient zum vervielfältigen (amplifizieren) genau definierter, kurzer DNA- Abschnitte durch eine *in vitro* DNA Replikation. Anhand dieser Methode können kleinste DNA Mengen, beispielsweise ein einzelnes Gen oder aber auch nur ein Teil eines Gens, eindeutig nachgewiesen werden. Nach Auftrennung der DNA-Doppelhelix in Einzelstränge (Denaturierung) bei 95°C wird mittels Hybridisierung (Annealing bei 60°C) zweier Primer, welche jeweils an die komplementären Bereiche der DNA Stränge binden, der zu amplifizierende DNA Bereich flankiert. Anschließend findet mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und der dNTPs die Bildung eines neuen DNA Doppelstranges (Elongation bei 72°C) statt. Nach vielfacher Wiederholung jener soeben genannten Reaktionszyklen (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird die Menge des untersuchten DNA Fragments unter optimalen Bedingungen theoretisch nach jedem Reaktionszyklus verdoppelt.

Hingegen handelt es sich bei der RT-PCR (Reverse-Transkriptase-PCR) um eine Variante der DNA-PCR, welche zum Nachweis von RNA herangezogen wird. Als Template dient die cDNA. Hierüber konnte in der vorliegenden Arbeit die (modifizierte) mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (unter dem Einfluss diverser Stimulanzen)

nachgewiesen werden. Um die cDNA zu amplifizieren wurde Omniscript gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. SYBER Green primer von Qiagen wurden als Primer in der quantitativen RT-PCR eingesetzt, welche im ABI PRISMTM 7700 System durchgeführt wurde.

Folgende Primersequenzen wurden analysiert:

GAPDH	5'-CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT-3' 5'-AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC-3'
ET <sub>A</sub> -R	5'-ATT GCC CTC AGC GAA CAC-3' 5'-CAA CCA AGC AGA AAG ACG-3'

*Tabelle 4: Übersicht Primersequenzen*

### 3.5 Datenanalyse

Mittels einer etablierten Rechenmethode, die Delta Delta ct- Methode ( $\Delta\Delta ct$ ) (Livak and Schmittgen 2001), wurden aus den nach Ablauf der PCR erhaltenen Rohdaten, Werte ermittelt, anhand deren eine Aussage hinsichtlich des quantitativen Unterschieds in der Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Molekularebene zwischen zwei Gruppen (stimulierte vs. unstimulierte Zellen) getroffen werden konnte. Auf ein konstant exprimiertes, nicht reguliertes Referenzgen (housekeeping gene), das hGAPDH (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), wurde Bezug genommen und die Expression des Referenzgens von jener des Zielgens subtrahiert (Delta ct/ $\Delta ct$ ). Anschließend wurde aus den  $\Delta ct$ -Werten beider Gruppen der Delta Delta ct/ $\Delta\Delta Ct$ -Wert ermittelt (siehe Tabelle 5).

Hierüber kann nun erkannt werden, ob Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen stimulierter Zellkultur und unstimulierter Kontrolle vorliegen. Werte  $> 1$  entsprechen einer Zunahme der ET<sub>A</sub>-R Expression im Vergleich zur Kontrolle. Werte  $< 1$  bezeichnen eine Abnahme der Rezeptorexpression, wohingegen Ratio-Werte = 1 auf eine unveränderte Genexpression hindeuten. Zum besseren Verständnis sei beispielhaft angeführt, dass eine Ratio von 1,5 eine 50%ige Zunahme, hingegen eine Ratio von 0,5 eine 50%ige Abnahme der Genexpression beschreibt.



$$\Delta ct = ct(\text{Zielgen}) - ct(\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta ct = \Delta ct(\text{stimulierte Kontrolle}) - \Delta ct(\text{unstimulierte Kontrolle})$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta ct}$$

*Tabelle 5: relative Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta ct$  Methode*

### 3.6 Statistische Analyse

Zur Signifikanzbestimmung wurde - nach Rücksprache mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der LMU München - der nicht-parametrische Wilcoxon-Signed-Rank-Test verwendet.

$P < 0,05$  (graphisch mit „\*“ gekennzeichnet) beschreibt einen signifikanten Unterschied.

Alle Telexperimente wurden vier ( $n=4$ ) bzw. sieben Mal ( $n=7$ ), mit jeweils neuen Lösungen und Zellkulturen, durchgeführt.

Als statistisches Instrument wurde SPSS (Version 20, Leibniz Rechenzentrum München) verwendet.

### 3.7 Graphische Darstellung im Balkendiagramm

Das Balkendiagramm zeigt die Modifizierung der  $ET_A$ -R Genexpression humaner mikrovaskulärer Endothelzellen nach 6-, 24- und 48-stündiger Inkubation mit den entsprechenden Testsubstanzen der Teilansätze (s.3.2). Die Abszisse führt die Stimulanzen (nach 6, 24, 48 Stunden) an. Auf der Ordinate ist die Stimulanzen-induzierte, x-fache Vermehrung/Reduktion der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, gemäß der  $\Delta\Delta ct$  Methode, dargestellt. Hierzu wurde der Mittelwert der Ratio Werte von  $n=4$  bzw.  $n=7$  ermittelt. Die Skalierung der Ordinate ist logarithmisch. Die Abszisse schneidet die Ordinate bei 1, wobei 1 den Wert der Kontrolle beschreibt. Werte  $> 1$  bedeuten eine Zunahme der Genexpression des  $ET_A$ -Rezeptors im Vergleich zur Kontrolle. Werte  $< 1$  entsprechen einer Abnahme der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors nach Stimulation (s.3.6.).



---

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 ET<sub>A</sub>-R Expression von HMEC unter Stresshormonstimulation

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit 360 ng/ml Cortisol, 1 µg/ml CRH und 10 µg/ml Noradrenalin für 6, 24 und 48 Stunden stimuliert (=Einfachstimulation). Anschließend wurde mittels RT-PCR die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors untersucht (Abb.7).

- Nach *6-stündiger Inkubation* war unter dem Einfluss von Cortisol, CRH und Noradrenalin jeweils eine signifikant gesteigerte Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisbar. So ergab Cortisol eine 68%ige ( $1,68 \pm 0,5 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) Zunahme, CRH einen beinahe fünffachen Anstieg ( $4,92 \pm 0,8 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) und Noradrenalin eine Verdoppelung ( $2,22 \pm 1,0 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors.
- Nach *24-stündiger Inkubation* zeigte CRH die stärkste Zunahme der ET<sub>A</sub>-R Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle: die mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors vermehrte sich signifikant um das 168-Fache ( $168,43 \pm 86,3 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ). Cortisol (+6%;  $1,06 \pm 0,4 \Delta\Delta\text{ct}$ ) und Noradrenalin (+94%;  $1,94 \pm 0,2 \Delta\Delta\text{ct}$ ) bewirkten ebenso jeweils eine Zunahme der ET<sub>A</sub>-R Genexpression, allerdings ohne statistische Signifikanz.
- Nach der längsten Inkubationsperiode (*48 Stunden*) ergab ausschließlich Noradrenalin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine signifikante Zunahme der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors (+67%;  $1,67 \pm 0,6 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ). Cortisol und CRH induzierten eine tendenziell hochregulierte Genexpression, allerdings ohne Signifikanz.

- 
- Ein einheitlicher zeitabhängiger Effekt der ET<sub>A</sub>-R Expression konnte nicht gezeigt werden (Abb. 7):
    - Nach 24 Stunden kam es unter der Stimulation mit **CRH** im Vergleich zum CRH-6-Stundenwert signifikant zu einer 34-fachen Zunahme der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors. Nach 48 Stunden wurde die geringste Anzahl der mRNA Kopien des ET<sub>A</sub>-Rezeptors extrahiert. So wurde nach 48 Stunden verglichen zum 24-Stundenwert signifikant eine 99%ige weniger starke Hochregulation des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und eine um 77% weniger starke Zunahme gegenüber dem 6-Stundenwert reduzierte Zunahme dokumentiert.
    - **Cortisol** zeigte nach 24 Stunden - im Vergleich zur mRNA Menge nach 6 Stunden - signifikant eine weniger starke Zunahme der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors (relative Abnahme um 37% im Vgl. zum 6-Stundenwert; p<0,05). Nach 48 Stunden zeigte sich im Vergleich zum 24-Stundenwert tendenziell wieder ein gesteigerter hochregulierender Effekt, aber ohne Signifikanz.
    - Nach 24 Stunden kam es unter dem Einfluss von **Noradrenalin** im Vergleich zum 6-Stundenwert signifikant zu einer weniger starken Zunahme der ET<sub>A</sub>-R Expression (relative Abnahme um 13% im Vgl. zum 6-Stundenwert; p<0,05). Nach 48 Stunden kam es abermals zu einer signifikant weniger starken Hochregulierung der ET<sub>A</sub>-R mRNA im Vergleich zum 24-Stundenwert (relative Abnahme um 14% im Vgl. zum 24 Stundenwert; p<0,05).

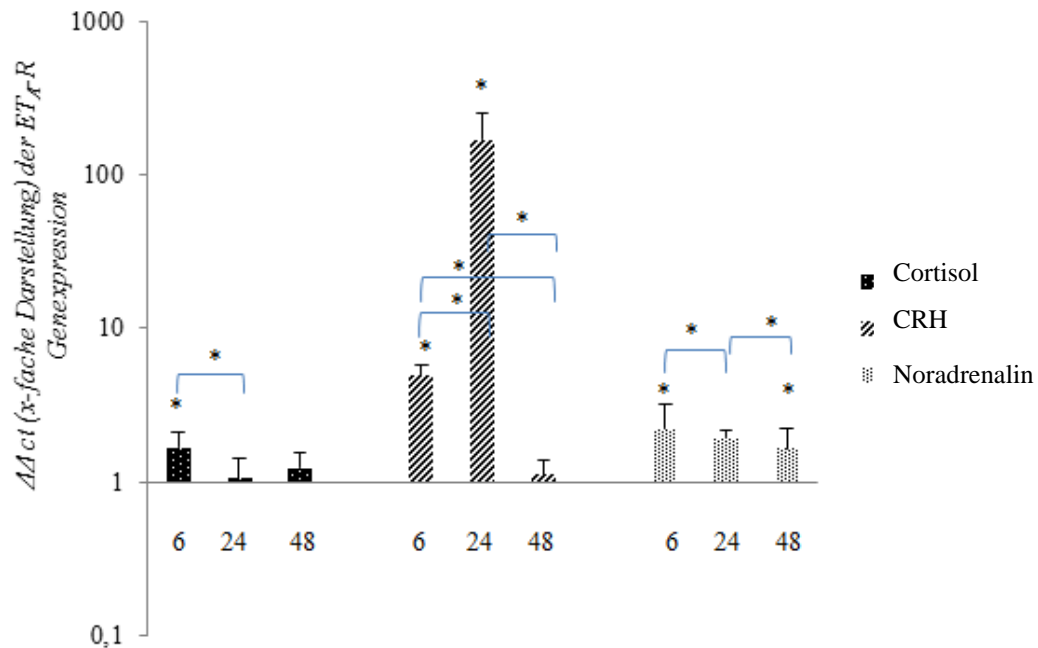


Abb.7 zeigt den Einfluss von Stress (Cortisol, CRH, Noradrenalin) auf die ET<sub>A</sub>-R Genexpression (PCR) humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (n=7) nach 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. \*=  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle sowie zwischen den Zeitpunkten.

## 4.2 ET<sub>A</sub>-R Expression von HMEC unter Geschlechtshormonstimulation

In diesem Versuchsansatz (=Einfachstimulation) wurden HMEC mit 27 ng/ml ( $=10^{-7}$ M)  $\beta$ -Östradiol und 29 ng/ml ( $=10^{-7}$ M) Testosteron stimuliert. Nach 6, 24 und 48 Stunden wurden mittels RT-PCR die mRNA Kopien des ET<sub>A</sub>-Rezeptors ermittelt (Abb.8):

- Unter der Stimulation mit  **$\beta$ -Östradiol** zeigte sich signifikant eine reduzierte Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors über die Zeit von durchschnittlich 92% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

6 Stunden:  $0,08 \pm 0,04 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

24 Stunden:  $0,09 \pm 0,04 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

48 Stunden:  $0,07 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

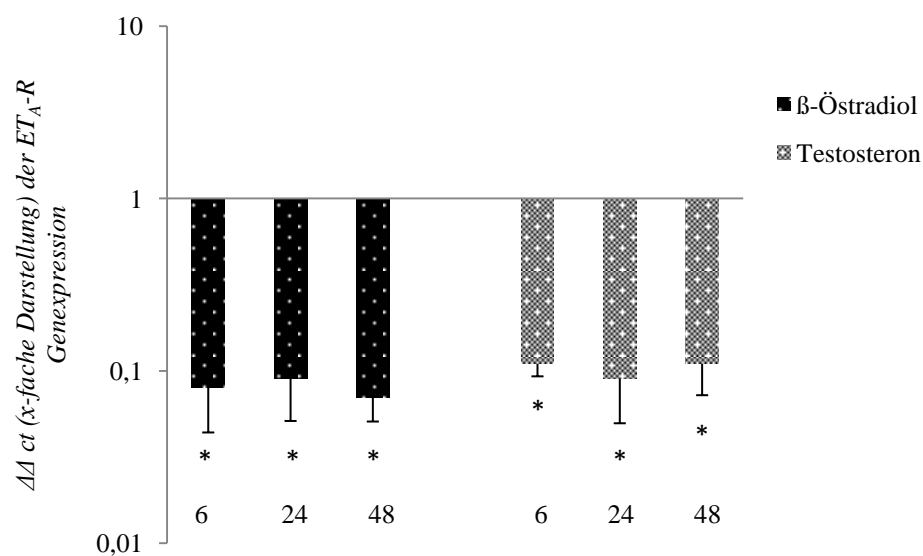
- Die Stimulation mit **Testosteron** induzierte signifikant eine Abnahme der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors über die Zeit von durchschnittlich etwa 90% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

6 Stunden:  $0,11 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

24 Stunden:  $0,09 \pm 0,04 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

48 Stunden:  $0,11 \pm 0,04 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

- Es konnte kein zeitabhängiger Effekt dokumentiert werden.



---

*Abb.8 zeigt die Modifikation der  $ET_A$ -R Genexpression (PCR) unter dem Einfluss von  $\beta$ -Östradiol und Testosteron nach 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; n=7; \*=  $p<0,05$*

---

### 4.3 ET<sub>A</sub>-R Expression von HMEC im Co-Stimulationsversuch

#### 4.3.1 Geschlechtshormone und anschließend Zugabe von Stresshormonen

In diesem dritten Versuchsansatz wurde untersucht, inwiefern die Anzahl der ET<sub>A</sub>-Rezeptoren humaner mikrovaskulärer Endothelzellen durch das gleichzeitige Einwirken von  $\beta$ -Östradiol bzw. Testosteron und jeweils einem Stresshormon (Cortisol, CRH, Noradrenalin) modifiziert wird. Zuerst erfolgte die Geschlechtshormonstimulation und nach 30 Minuten die Zugabe des Stresshormons. Die Konzentrationen wichen nicht von jenen der ersten beiden Versuchsreihen ab (4.1 und 4.2).

#### $\beta$ - Östradiol + Stresshormon (Cortisol / CRH / Noradrenalin)

- Nach 6, 24, 48 Stunden war der ET<sub>A</sub>-R unter allen Co-Stimulationen signifikant weniger häufig exprimiert verglichen zur unstimulierten Kontrolle.
  - $\ddot{O}$ +Cortisol bewirkten nach 6 Stunden die deutlichste Reduktion der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors (-94%;  $0,06 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ,  $p < 0,05$ ). Nach 24 Stunden kam es zu einer 90%igen ( $0,1 \pm 0,04 \Delta\Delta ct$ ,  $p < 0,05$ ) und nach 48 Stunden zu einer 91%igen ( $0,09 \pm 0,03 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$ ) Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.
  - Die Co-Stimulation  $\ddot{O}$ +CRH zeigte ebenso die deutlichste Reduktion der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach 6 Stunden (-93%;  $0,07 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ,  $p < 0,05$ ). Nach 24 Stunden wurde der Rezeptor um 91% ( $0,09 \pm 0,03 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$ ) und nach 48 Stunden um 92% ( $0,08 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$ ) verglichen zur unstimulierten Kontrolle herunterreguliert.



- *Ö+Noradrenalin* vermittelten nach 6 Stunden eine 92%ige ( $0,08 \pm 0,03 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$ ), nach 24 und 48 Stunden jeweils eine 91%ige Herunterregulierung ( $0,09 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$  und  $0,09 \pm 0,02 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$ ) des  $ET_A$ -Rezeptors.
- *Ö+Cortisol* zeigte als einzige Co-Stimulation signifikante Ergebnisse innerhalb der einzelnen Inkubationszeitpunkte:
- Im Vergleich zur Herunterregulierung des  $ET_A$ -Rezeptors nach 6 Stunden Inkubationszeit nahm diese nach 24 und 48 Stunden signifikant ab.

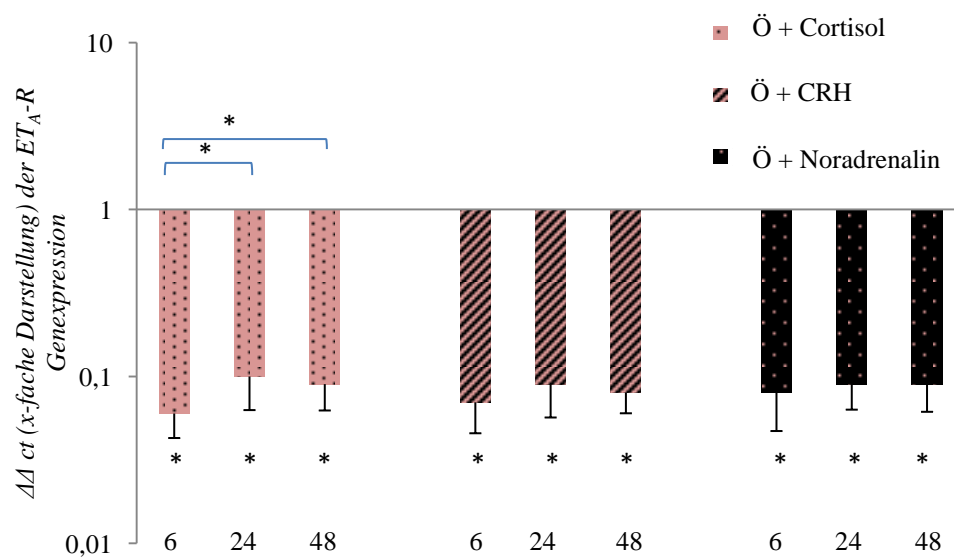


Abb.9 zeigt die veränderte Genexpression des  $ET_A$ -Rezeptors (PCR) unter dem Einfluss von Östrogen mit jeweils einem Stresshormon (Cortisol, CRH, Noradrenalin) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach 6, 24 und 48 Stunden;  $n=7$ ;  $Ö = \beta$ -Östradiol;  $*=p < 0,05$

---

**Testosteron + Stresshormon (Cortisol / CRH / Noradrenalin)**

- Nach 6, 24, 48 Stunden war der ET<sub>A</sub>-R unter allen Co-Stimulationen signifikant weniger häufig exprimiert verglichen zur unstimulierten Kontrolle (Abb.10):
  - *T+Cortisol* zeigten nach 48 Stunden (-90%;  $0,10 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle den signifikant stärksten herunterregulierenden Effekt auf die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors. Nach 6 Stunden wurde eine 89%ige ( $0,11 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) und nach 24 Stunden eine 88%ige ( $0,12 \pm 0,04 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) Abnahme der ET<sub>A</sub>-R Expression verzeichnet.
  - *T+CRH* bewirkten schon nach 6 Stunden die stärkste Abnahme der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors (-92%;  $0,08 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ). 24 Stunden: -86%;  $0,14 \pm 0,03 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ; 48 Stunden: -87%;  $0,13 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$
  - Auch *T+Noradrenalin* zeigten mit einer 89%igen ( $0,11 \pm 0,03 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ) Reduktion der ET<sub>A</sub>-R mRNA den deutlichsten Effekt nach 48 Stunden. 6 Stunden: -82%;  $0,12 \pm 0,03 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$ ; 48 Stunden: -85%;  $0,15 \pm 0,02 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$
- Nur die Co-Stimulation mit CRH ergab signifikante Werte zwischen den einzelnen Inkubationszeitpunkten:
  - Nach 24 sowie nach 48 Stunden zeigten sich weniger starke Herunterregulationen der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors verglichen zur ET<sub>A</sub>-R mRNA nach 6 Stunden.

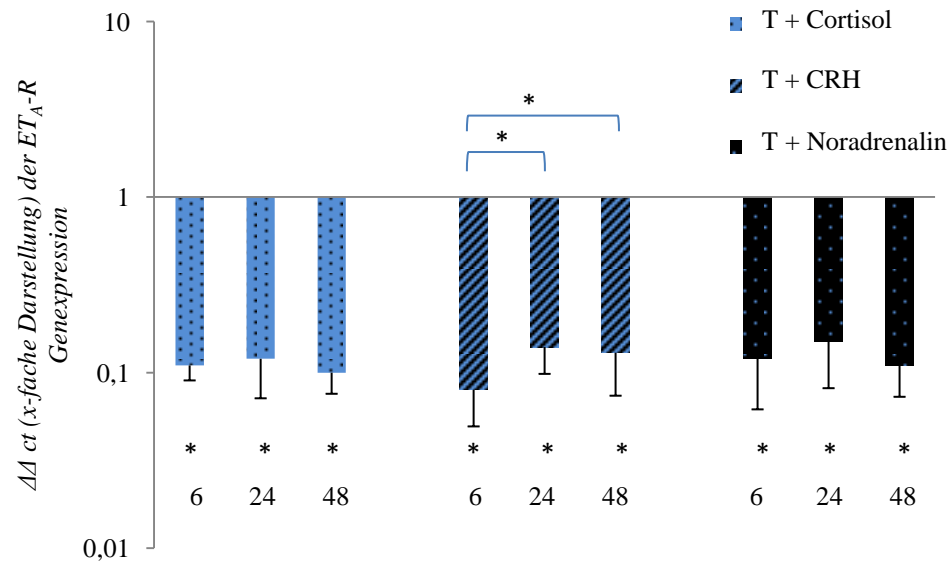


Abb. 10 stellt die veränderte  $ET_A$ -R Genexpression (PCR) unter der Co-Stimulation von Testosteron und dem jeweiligen Stresshormon (Cortisol, CRH, Noradrenalin) nach 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dar;  $n=7$ ; T = Testosteron,  $*=p<0,05$

---

### 4.3.2 Stresshormon und anschließend Zugabe von Geschlechtshormonen

In diesem Versuchsansatz war von Interesse festzustellen, ob die Reihenfolge der Zugabe der Stimulanzen eine Rolle spielt und Einfluss auf die Genexpression nimmt. Daher fand - im Unterschied zu 4.3.1 – eine Vorinkubation mit CRH statt und nach einem 30-minütigen Zeitintervall wurde jeweils ein Geschlechtshormon ( $\beta$ -Östradiol bzw. Testosteron) zugegeben. Wir beschränkten diese Versuchsreihe bei  $n=4$  ausschließlich auf das Stresshormon CRH, da es bei der Einfachstimulation (Abb.7) den ausgeprägtesten Effekt zeigte. Die Konzentrationen entsprachen den Vorversuchen.

Abb.11 zeigt die in diesem co-stimulierten Versuchsteil ermittelte Expressionen des  $ET_A$ -Rezeptors. Auch ist die CRH-Einfachstimulation aus 4.1, um besser Vergleiche ziehen zu können, dargestellt.

- *Nach 6 Stunden* zeigte sich sowohl unter der  $\beta$ -Östradiol-Co-Stimulation (+84%;  $1,84 \pm 0,55\% \Delta\Delta ct$ ), als auch unter der Testosteron-Co-Stimulation (+52%;  $1,52 \pm 0,83 \Delta\Delta ct$ ) eine hochregulierte Rezeptorexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.
- *Nach 24 Stunden* kam es zum deutlichsten Anstieg der mRNA Kopien des  $ET_A$ -Rezeptors. CRH+Ö bewirkten eine fünffache ( $5,11 \pm 2,35 \Delta\Delta ct$ ) und CRH+T eine dreifache ( $3,14 \pm 0,68 \Delta\Delta ct$ ) Zunahme der  $ET_A$ -R Genexpression verglichen zur unstimulierten Kontrolle.
- *Nach 48 Stunden* wurde im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle eine Hochregulierung der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors beobachtet, hingegen mit abnehmender Tendenz zum 24 stündigen Zeitpunkt (CRH+Ö:  $1,23 \pm 0,20 \Delta\Delta ct$ ; CRH+T:  $1,01 \pm 0,09 \Delta\Delta ct$ ).

- Nach Rücksprache mit dem Statistikamt wurde auch in dieser Versuchsreihe der nicht-parametrische Wilcoxon-Test verwendet. Es zeigten sich hierunter im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Signifikanzen, was auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist. Dennoch möchte ich an dieser Stelle die hochregulierenden Tendenzen der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors in Abb.11 darstellen, zumal sich interessanterweise nach allen drei Zeitpunkten (6, 24, 48 Stunden) ein zur CRH-Einfachstimulation ähnliches Expressionsmuster mit hochreguliertem  $ET_A$ -R zeigte.

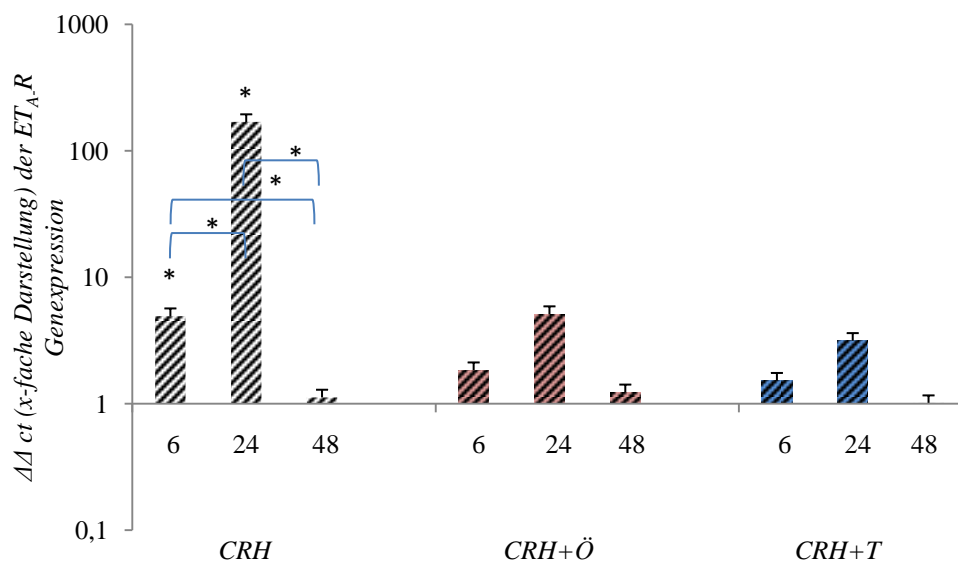


Abb.11 stellt die modifizierte  $ET_A$ -R Genexpression humaner mikrovaskulärer Endothelzellen unter der Einfachstimulation mit CRH und den Co-Stimulationen mit entweder  $\beta$ -Östradiol oder Testosteron nach 6, 24 und 48 Stunden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dar. Die CRH Einfachstimulation wurde bei  $n=7$ , hingegen die Co-Stimulationen bei  $n=4$  durchgeführt. Deutlich ist ein ähnliches Expressionsmuster über die Zeit unter allen drei Stimulationsansätzen zu erkennen.

Ö =  $\beta$ -Östradiol; T = Testosteron; \* =  $p < 0,05$

#### 4.4 ET<sub>A</sub>-R Expression von HMEC unter BQ-123

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123 (610 ng/ml) auf die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach einem Tag, sowie nach drei, fünf und sieben Tagen bei n=6 untersucht (Abb.12).

- Es zeigte sich an jedem Tag eine signifikante Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

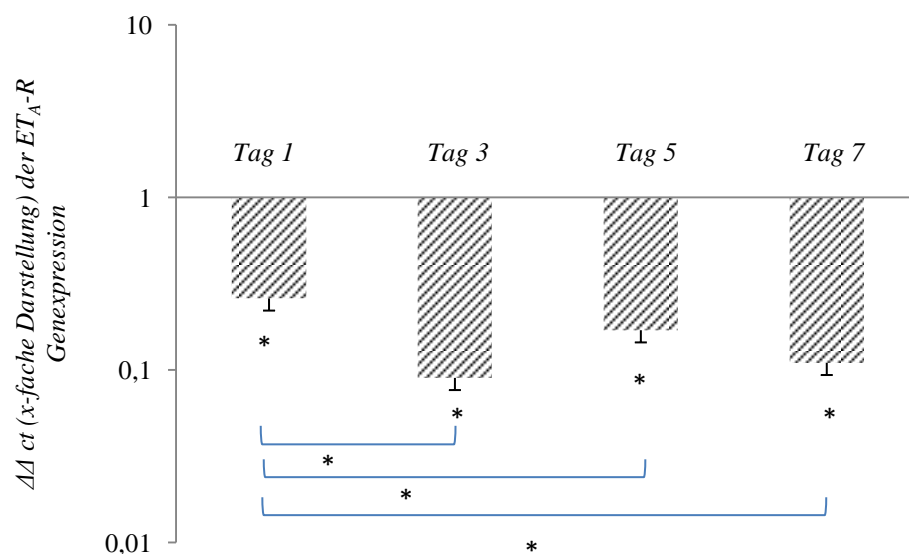
Tag 1: -74%;  $0,26 \pm 0,03 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

Tag 3: -91%;  $0,09 \pm 0,03 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

Tag 5: -83%;  $0,17 \pm 0,05 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

Tag 7: -89%;  $0,11 \pm 0,05 \Delta\Delta ct$ ;  $p < 0,05$

- Im Vergleich zu Tag 1 kam es nach 3, 5 und 7 Tagen Inkubationszeit zu einer signifikant ausgeprägteren Herunterregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors.



---

*Abb.12 zeigt die unter dem Einfluss von BQ-123 modifizierte ET<sub>A</sub>-R Genexpression (PCR) nach Tag 1, 3, 5 und 7 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; n =6, \*=p<0,05*

#### **4.5 ET<sub>A</sub>-R Expression von HMEC unter ECE-Inhibitor (ECE-I)**

In diesem Versuchsteil wurde der Einfluss des Endothelin-Konversionsenzym-Inhibitors (ECE-I) auf die ET<sub>A</sub>-Rezeptorexpression ermittelt. Analog zu 4.4 wurde die mRNA nach 1,3,5,7 Tagen für n=6 extrahiert (Abb.13).

- Auch hier zeigte sich eine statistisch signifikante Rezeptor-Herunterregulierung zu jedem einzelnen Zeitpunkt im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

Tag 1: -68%;  $0,32 \pm 0,03 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$

Tag 3: -88%;  $0,12 \pm 0,04 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$

Tag 5: -80%;  $0,20 \pm 0,05 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$

Tag 7: -88%;  $0,12 \pm 0,03 \Delta\Delta\text{ct}$ ;  $p < 0,05$

- Die Ausbeute der mRNA war nach 3, 5 und 7 Tagen signifikant verringert im Vergleich zur Ausbeute nach nur einem Tag.

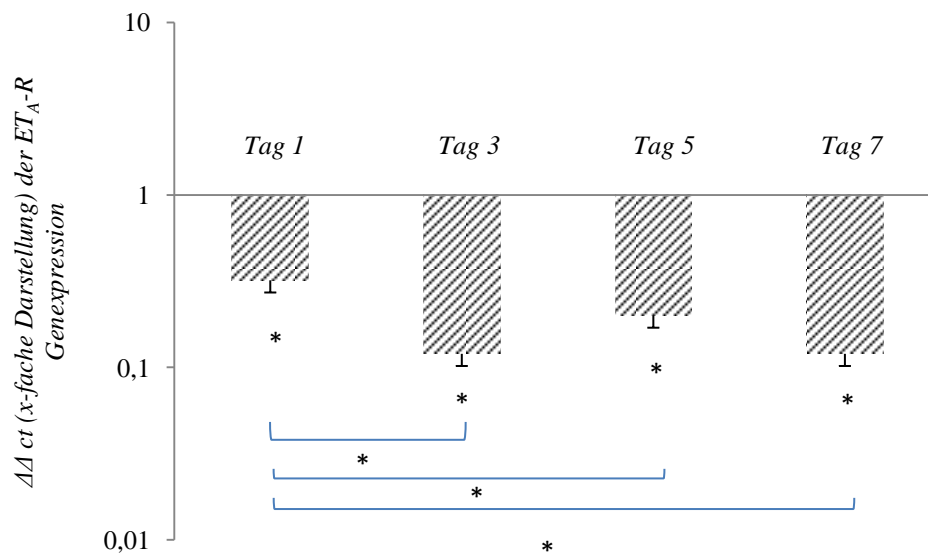


Abb.13 zeigt die Modifikation des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Genebene (PCR) unter dem Einfluss von ECE-I nach einem Tag, drei, fünf und sieben Tagen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; n=6, \*=p<0,05

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst

Erstmalig wurde gezeigt, dass Stresshormone einen bedeutenden Einfluss auf die ET<sub>A</sub>-Rezeptor Expression humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC) haben. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl das chronische Stresshormon Corticotropin-Releasing Hormon (CRH), als auch die akuten Stresshormone Cortisol und Noradrenalin zu einer signifikanten Hochregulierung des Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptors (ET<sub>A</sub>-R) führen.

Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle fand sich nach 6 stündiger Inkubationszeit mit den Stresshormonen Cortisol und Noradrenalin im Zeitverlauf (über 6, 24, 48 Stunden) der stärkste Effekt im Sinne einer Hochregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors, während CRH nach 24 Stunden Inkubationszeit die ausgeprägteste Hochregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors aufwies.

Unter Einfluss der Geschlechtshormone β-Östradiol und Testosteron wurde eine statistisch signifikante Abnahme der ET<sub>A</sub>-R Genexpression gezeigt (im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle), wobei kein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet werden konnte.

In der Co-Stimulation der beiden soeben angeführten Hormonsysteme (Stresshormone, Geschlechtshormone) überwog der Effekt des zuerst in die Zellkultur zugegebenen Stimulans.



---

Außerdem wurden hemmende Effekte – im Sinne einer ET<sub>A</sub>-R Herunterregulierung - unter sowohl dem selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten BQ-123, als auch dem Endothelin-Konvertierungsenzym-Inhibitors (ECE-I) nachgewiesen.

## **5.2 Der Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor unter Einfluss von Stresshormonen**

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass etablierte Stresshormone (CRH, Cortisol, Noradrenalin) zu einer Modifikation des Endothelin-Systems im Sinne einer Hochregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors führen.

### **5.2.1 Zeitverlauf des CRH-vermittelten Effekts**

Wie oben bereits angeführt, kam es unter dem Einfluss von CRH zu allen Zeitpunkten (6, 24, 48 Stunden Inkubationszeit) zu einem Anstieg der ET<sub>A</sub>-Rezeptor Genexpression, wobei der stärkste Effekt nach 24 Stunden zu verzeichnen war. Folgende Fragen stehen hiermit im Vordergrund:

- I. Worauf ist die außerordentlich starke Zunahme der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach 24 Stunden zurückzuführen?
- II. Woraus resultiert der relative Abfall der Rezeptorexpression nach insgesamt 48 Stunden?

Um erstere Frage beantworten zu können, muss an dieser Stelle auf das wechselseitige stimulierende Zusammenspiel zwischen HPA-Achse und Endothelin-System verwiesen werden. Systemisch appliziertes ET-1 führte zur Aktivierung der HPA-Achse, wodurch die gesteigerte Freisetzung von CRH resultierte (Malendowicz, Belloni et al. 1998). Simoncini et al. demonstrierten *in vitro* eine ET-1 induzierte, *endogene* CRH Freisetzung humaner umbilikal-venöser Endothelzellen (HUVEC) (Simoncini, Apa et al. 1999). Angelehnt an Simoncinis Beobachtungen könnte also die in der vorliegenden Arbeit verzeichnete explosive Hochregulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach 24 Stunden folgendermaßen erklärt werden: exogen zugeführtes CRH führt zur Freisetzung von ET-1 kultivierter, humaner Endothelzellen (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006; Nickel, Deutschmann et al. 2009). Über die

---

auto- und parakrine Eigenschaft des Endothelins (Wagner, Christ et al. 1992) kann eine hochaffine Bindung an die membranständigen ET<sub>A</sub>-Rezeptoren der Endothelzellen angenommen werden und könnte - gemäß Simoncinis Ergebnissen - eine *endogene* CRH-Synthese/Freisetzung induzieren. Hiermit würde das exogen zugeführte Stimulans in seiner Menge vervielfältigt und maximaler Stresseinfluss auf die Zellen mit konsekutiver ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Hochregulierung ausgeübt werden. Letztgenannte Annahme kann anhand bereits nachgewiesener konzentrationsabhängiger Effekte von CRH auf das Endothelin-System (ET-1) bestärkt werden ( $10^{-7}$  mol/l effektiver als  $10^{-9}$  mol/l) (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006), bleibt aber dennoch - hinsichtlich der ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Regulierung in Abhängigkeit von der Konzentration - Gegenstand zukünftiger Studien.

Die nach 48 Stunden beobachtete Abnahme des ET<sub>A</sub>-Rezeptors könnte durch Erschöpfung der *endogenen* CRH Produktion erklärt werden. Auch wäre in Erwägung zu ziehen, dass das *exogen* zugeführte CRH – möglicherweise aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit - nicht mehr ausreichend wirksam ist. Jeweils beide Effekte, unabhängig voneinander, würden eine Reduktion der Gesamtkonzentration des im Medium befindlichen CRH bewirken, worin abermals die Hypothese eines konzentrationsabhängigen Effektes des CRH – auch hinsichtlich einer modulierten ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Expression - Eingang in die Diskussion findet.

Angaben bezüglich der Halbwertszeit des Hormons lassen sich in der Literatur nicht einheitlich finden. Ursächlich hierfür ist die Verwendung unterschiedlicher Modelle: *in vitro* vs. *in vivo*. Im Organismus ist durch die Bindung an ein spezifisches Trägerprotein (CRH-Bindungsprotein) – von pathologischen Gesundheitszuständen mit gesteigerter (Morbus Addison, Hypoglykämie) oder reduzierter CRH Freisetzung (Stoßtherapie mit Hydrocortison) abgesehen – eine Reduktion und folglich eine Inaktivierung des biologisch aktiven CRH zu berücksichtigen (McLean and Smith 2001). Auch liegen speziesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Hormon-Plasmahalbwertszeiten den uneinheitlichen Literaturangaben zugrunde (Saphier, Faria et al. 1992). Ferner bleibt zu klären, ob beispielsweise die von den Endothelzellen gebildeten vasoprotektiven Substanzen (NO, PGI<sub>2</sub>) nach relativer Langzeitinkubation (48 Stunden) die endogene CRH-Synthese inhibieren und infolgedessen die mRNA weniger stark hochreguliert wird.

---

### 5.2.2 Zeitverlauf des Cortisol-vermittelten Effekts

Das akute Stresshormon Cortisol zeigte ausschließlich nach 6-stündiger Inkubation eine signifikante Hochregulierung der ET<sub>A</sub>-Rezeptor Genexpression.

Unter der Voraussetzung, dass Steroidhormone – zu welchen auch Cortisol zählt – an intrazelluläre Steroidhormonrezeptoren binden und in der Folge die Expression Cortisol-sensitiver Gene regulieren, könnte der in dieser Arbeit beobachtete Kurzzeiteffekt folgendermaßen erklärt werden: durch intrazelluläre Aufnahme des Hormons und ausschließlich einmaliger Stimulation der HMEC zum Zeitpunkt 0 könnte – ähnlich zu obig Diskutiertem (5.2.1) – der abnehmende Effekt des Cortisols über die Zeit Folge der Konzentrationsabnahme des Stresshormons im Medium sein. Es stellt sich also auch an dieser Stelle die Frage nach der Halbwertszeit des Hormons, welche bei kürzerer Dauer die Abnahme der ET<sub>A</sub>-R Expression erklären könnte. In der Literatur ließen sich keine einheitlichen Angaben über die Halbwertszeit von Cortisol finden, wodurch abermals die Wichtigkeit der Unterscheidung zwischen *in vitro* und *in vivo* (→Metabolisierung, Clearance, Cortisol-bindendes Globulin) Modellen erkannt wird.

### 5.2.3 Zeitverlauf des Noradrenalin-vermittelten Effekts

Die Stimulation mit Noradrenalin zeigte nach 6 Stunden, analog zu Cortisol, eine signifikante Zunahme der Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors, hinweisend auf eine schnelle Wirkung - im Sinne eines akuten Stresshormons. Auch könnte die signifikante Abnahme der Rezeptorexpression nach 24 Stunden im Vergleich zum 6-Stundeneffekt dem raschen, kurzfristigen Effekt eines akuten Stresshormons entsprechen.

Schwierig zu erklären ist allerdings die Tatsache, dass nach 48-stündiger Inkubationszeit mit Noradrenalin die Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors – im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle - wieder signifikant anstieg.

Ob eine Noradrenalin-induzierte, gesteigerte, endotheliale Zytokinfreisetzung zu einem späteren Zeitpunkt – wie es auch Gornikiewicz et al. an HMEC beobachteten (Gornikiewicz, Sautner et al. 2000) – stattfindet und sekundär eine verzögerte, Zytokin-induzierte ET<sub>A</sub>-Rezeptor Hochregulierung resultiert (Ahnstedt, Stenman et al. 2012), bleibt spekulativ und bedarf somit weiterer Untersuchungen.

Auch wäre – analog zur endogenen CRH Synthese (Simoncini, Apa et al. 1999) – eine endogene endotheliale Noradrenalin Synthese theoretisch möglich, wodurch der unerwartete hochregulierende Effekt zum späteren Zeitpunkt (48 Stunden) über eine Zunahme der Stresshormonkonzentration im Medium erklärt werden könnte.

Abermals ist ausdrücklich darauf hinzuweisen, dass es sich lediglich um rein hypothetische Erklärungsmodelle handelt. Ergänzende Studien wären somit erforderlich, um die Richtigkeit der Annahmen zu untermauern beziehungsweise irrige Schlussfolgerungen nachzuweisen.

#### **5.2.4 Die ET<sub>A</sub>-R Expression nach 48 Stunden – mögliche Erklärungen**

Endothelin-Rezeptoren unterliegen, wie auch zahlreiche andere oberflächliche G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, einer Liganden-induzierten Desensibilisierung (Cyr, Rudy et al. 1993; Khac, Naze et al. 1994; Rubanyi and Polokoff 1994; Freedman, Ament et al. 1997). Demzufolge werden nach Ligandenbindung phosphorylierende Prozesse am Rezeptor initiiert, wodurch die Signalweiterleitung ins Zellinnere aufgehoben wird (Freedman, Ament et al. 1997; Pierce and Lefkowitz 2001). Basierend auf jenem Nachweis der komplexen, regulierenden Agonisten-induzierten Rezeptordesensibilisierung, lässt sich nachstehendes Exempel auch für das Endothelin-System konstruieren:

Durch *in vitro* Stressstimulation kommt es zu einer signifikant erhöhten ET-1 Sekretion humaner mikrovaskulärer Endothelzellen nach 6 Stunden (Nickel, Deutschmann et al. 2009), zu einer signifikant hochregulierten ET<sub>A</sub>-R *Genexpression* nach 6 Stunden, sowie trotz Verzögerung – vermutlich bedingt durch translationale Prozesse - zu einer signifikant gesteigerten ET<sub>A</sub>-R *Proteinexpression* nach 24 Stunden (Nickel, Deutschmann et al. 2009). Über die autokrine Wirkweise des ET-1 kann eine rückläufige ET-1/ET<sub>A</sub>-R-Bindung vermutet werden. Bei kontinuierlicher Liganden-induzierter Rezeptoraktivierung wird der ET<sub>A</sub>-R durch Phosphorylierung modifiziert und in seiner Funktion als Signalvermittler gehemmt. Die nach 48 Stunden beobachtete verringerte Expression der ET<sub>A</sub>-R mRNA könnte demnach Resultat einer ET-1-induzierten Rezeptordesensibilisierung nach Stressexposition sein. Demzufolge würde Stress keinen direkten Einfluss auf die Modifikation der ET<sub>A</sub>-R mRNA ausüben, sondern das durch das Einwirken von Stress vermehrt synthetisierte und freigesetzte ET-1 den eigentlichen, wesentlichen Induktor bzw. Inhibitor der transkriptionellen Regulation des ET<sub>A</sub>-Rezeptors darstellen.

Es stellen sich nun folgende wesentliche, in zukünftigen Studien zu klärende Fragen: Führt die exogene Zugabe von ET-1 auf HMEC zu einer Veränderung der Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Genebene im Sinne einer initialen Hochregulierung und späteren Herunterregulierung nach dem Prinzip der Rezeptordesensibilisierung? Oder aber binden Stresshormone nicht nur an Stresshormonrezeptoren, sondern zeigen auch affines Bindungsverhalten zum ET<sub>A</sub>-R, wonach sie gemäß der Hypothese der Rezeptordesensibilisierung als Liganden und Agonisten des ET<sub>A</sub>-Rezeptors fungieren?

In vielen Fällen erschöpft sich dieser regulierende Prozess der Desensibilisierung nicht an einer bloßen Entkopplung der Rezeptoren, sondern stellt lediglich den initiierten Schritt anschließender intrazellulärer Regulationsmechanismen dar: mittels Endozytose wird der ET-1/ET<sub>A</sub>-R-Komplex ins Zellinnere aufgenommen. Es folgt ein dort in Gang gesetzter Recycling-Mechanismus (Bremnes, Paasche et al. 2000) mit Reintegration des „gewonnenen“ Rezeptors an die Membranoberfläche, um abermals als Signalempfänger dienen zu können. Die Zelle versucht also via Rezeptor-Recycling Energie einzusparen und reduziert auf transkriptioneller Ebene die energieverbrauchende *de novo* Rezeptorsynthese.

Zur Bestimmung der ligandenabhängigen ET<sub>A</sub>-R Internalisierung bestimmten Bremnes et al. (Bremnes, Paasche et al. 2000) an transfizierten Chinesischen-Hamster-Ovarienzellen (CHO-Zellen) nach Stimulation mit Iod-radioaktiv markiertem ET-1 (<sup>125</sup>I-ET-1) mittels gamma-spektrometrischen Analysen den prozentualen Anteil des internalisierten <sup>125</sup>I-ET-1. Der Quotient der Radioaktivität nach Zelllyse und der Radioaktivität vor Lysierung, welche noch membrangebundene Rezeptoren implizierte, ergab den Anteil der ausschließlich internalisierten Rezeptoren. Bereits nach 10 Minuten wurden 25% der Rezeptoren internalisiert. Um intrazelluläre Transportwege des Rezeptors – sogenanntes Rezeptor-Trafficking - nach Internalisierung darzustellen, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen durchgeführt. Hierbei wurde erkannt, dass der internalisierte ET<sub>A</sub>-R bevorzugt perinukleär – entsprechend der Lokalisation eines am Rezeptor-Recycling beteiligten Kompartiments - lokalisiert zu sein scheint (Bremnes, Paasche et al. 2000).

Ob aber nun auch Endothelzellen über dieses ausgeklügelte Recycling-System - beschrieben am Modell der CHO-Zellen – verfügen und ob hierin die in dieser Arbeit beobachtete vermindert hochregulierte mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach relativer Langzeitinkubation (48 Stunden) Erklärung findet, kann an dieser Stelle nicht endgültig geklärt werden.

---

### **5.2.5 Interaktion zwischen Stresshormonen, Stressimitatoren, dem vasoaktiven ET-1 und dem signalvermittelten ET<sub>A</sub>-Rezeptor**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen im Einklang mit jenen von Chen et al. (Chen and Sun 2006), denen in einem *in vivo* Experiment mit Ratten der Nachweis einer stressinduzierten, signifikant hochregulierten ET<sub>A</sub>-R Expression auf Proteinebene gelang. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden dem Stressreiz Kälte ( $6,7\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ausgesetzt, während jene der Kontrollgruppe bei  $25^{\circ}\text{C}$  verweilten. Nach 1, 3 oder 5 Wochen wurden immunhistochemische Analysen an Kardiomyozyten sowie glatten Gefäßmuskelzellen durchgeführt. Die ET<sub>A</sub>-R Expression korrelierte signifikant positiv mit der Dauer der Kälteexposition. Ein direkter Vergleich der vorliegenden Arbeit und der Studie von Chen et al. ist – trotz übereinstimmender Ergebnisse hinsichtlich der stressinduzierten ET<sub>A</sub>-R Hochregulierung - nur bedingt möglich, da sich unterschiedliche Zeitverläufe darstellen. In der vorliegenden Studie wurde die Beobachtung auf maximal 48 Stunden begrenzt, wohingegen Chen et al. über mehrere Wochen den modulierenden Effekt von Stress untersuchten. Auch muss darauf hingewiesen werden, dass die unter Laborbedingungen erzielten *in vitro* Ergebnisse mit jenen im lebenden Organismus beobachteten *in vivo* Ergebnissen nur bedingt vergleich- oder übertragbar sind, zumal *in vivo* komplexe, wechselseitig sich beeinflussende Systeme aktiviert werden.

Beispielhaft sei der Einfluss von Schilddrüsenhormonen erwähnt, welche unter Kälteexposition vermehrt sezerniert werden und hierüber das Endothelin-System beeinflussen könnten (Chen and Sun 2006). Zudem muss angenommen werden, dass die chronische Kälteexposition der Tiermodelle von Chen et al. zur kontinuierlichen Aktivierung der Stresshormonachsen führte und hierdurch konstante Stresshormonkonzentrationen im Plasma resultierten. Hingegen bewirkte vermutlich die *in vitro* nur einmalige Stresshormonzugabe zum Zeitpunkt 0 – aufgrund der schon obig erläuterten Problematik hinsichtlich der Hormonhalbwertszeiten und der zeitabhängig abnehmenden Hormonkonzentrationen - eine begrenzte bzw. verkürzte Effektvermittlung. Hieraus ergäbe sich die Notwendigkeit, den Versuchsaufbau der vorliegenden Studie derart zu modifizieren, dass nicht nur eine einmalige, sondern eine mehrmalige Stimulation mit den Stresshormonen stattzufinden hat.

---

Xu et al. (Xu, Li et al. 2008) gelangen anhand der *in vivo* Studie mit Ratten der Nachweis einer stressinduzierten, gesteigerten Expression der ET<sub>A</sub>-R mRNA thorakaler Aortenringe: Isoprenalin, ein Noradrenalin-Derivat, wurde 10 Tage lang täglich subkutan injiziert. Am Versuchstag 11 erfolgten die experimentellen Untersuchungen. Die tägliche Verabreichung des Wirkstoffes, sowie die subkutane Darreichungsform mit erfahrungsgemäß resultierender erhöhter Bioverfügbarkeit (First-Pass-Effekt ↓) behoben in diesem Versuch vermutlich das Problem der schon mehrmals aufgezeigten zeitabhängig-verminderten Hormonkonzentration und hiermit der womöglich verminderten Hormonwirkung.

Pradhan et al. (Pradhan, Mondal et al. 2008) beobachteten an humanen aortalen Endothelzellen nach 24-stündiger Inkubation mit dem Stressimitator Cocain, welches *in vivo* die Wiederaufnahme von Katecholaminen in die Präsynapse adrenerger Nervenendigungen inhibiert und somit eine Wirkungsverlängerung von Noradrenalin induziert, eine signifikante Hochregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors auf Proteinebene (Western Blot). Trotz verzögerter (erst nach 24 Stunden!) erhöhter ET<sub>A</sub>-R Expression scheinen die Ergebnisse von Pradhan et al. - unter Berücksichtigung der Reihenfolge der Proteinbiosynthese (Transkription vor Translation) - mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit konkordant zu sein.

Die angeführten Studien (einschließlich die vorliegende Arbeit) untersuchten die Modifikation des ET<sub>A</sub>-Rezeptors. Nachstehende Studien stellten die Veränderung des *Peptidhormons* ET-1 in den Mittelpunkt ihrer Untersuchungen:

Kaddouras tierexperimentelle Studie mit Ratten (Kaddoura, Firth et al. 1996) gab den Hinweis auf eine nur kurzzeitige, akute Aktivierung des Endothelin-Systems nach kontinuierlicher, 7-tägiger Applikation von Noradrenalin mit der höchsten verzeichneten ET-1 mRNA Expression ventrikulärer Kardiomyozyten nach bereits einem Tag und kontinuierlich abnehmender Bildung in den darauffolgenden Tagen.

*In vitro* wurde nach Zugabe des Wachstumsfaktors TGF-β1 (Transforming Growth Factor) eine frühzeitige Induktion der ET-1 mRNA aortaler Schweineendothelzellen mit maximaler transkriptioneller Aktivität nach bereits 2 Stunden beobachtet (Kurihara, Yoshizumi et al. 1989). Auch Nickel et al. beobachteten *in vitro* unter der Stimulation mit Stresshormonen den stärksten Effekt hinsichtlich der ET-1 Freisetzung bereits nach 6 Stunden (Nickel, Deutschmann et al. 2009).

---

In Zusammenschau der Studienergebnisse von Kurihara et al., Kaddoura et al. und Nickel et al. (Kurihara, Yoshizumi et al. 1989; Kaddoura, Firth et al. 1996; Oie, Vinge et al. 1997; Nickel, Deutschmann et al. 2009), sowie der Resultate der vorliegenden Arbeit mit Nachweis einer signifikant hochregulierten ET<sub>A</sub>-R mRNA nach 6 Stunden, könnte eine nur *kurzfristige, akute*, Stimulanzien-induzierte Hochregulierung des gesamten Endothelin-Systems postuliert werden.

Die Ergebnisse von Xu et al. (Xu, Li et al. 2008) über die Isoprenalin-induzierte, hochregulierte mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors nach insgesamt 11-tägiger Versuchsdauer scheinen auf den ersten Blick konträr zum Postulat über eine nur kurzfristige Hochregulierung des Endothelin-Systems zu stehen. Allerdings wurden in Xus Studie zu keinem früheren Zeitpunkt Analysen hinsichtlich der ET<sub>A</sub>-R Expression angestellt, womit eine noch effektivere Hochregulierung der ET<sub>A</sub>-R mRNA nach nur wenigen Stunden/Tagen nicht auszuschließen ist. Inwiefern auch das von Xu et al. verwendete Untersuchungsmaterial (komplette Gefäßringe thorakaler Aorta) mit ausbleibender Analyse einzelner, isolierter (Endothel-) Zellen eine Vergleichbarkeit der soeben angeführten Studien zulässt, bleibt unklar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass akute und chronische Stresshormone eine Hochregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors induzieren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006; Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2007; Nickel, Deutschmann et al. 2009) konnten zudem einen hochregulierenden Effekt der Stresshormone auf das Peptidhormon ET-1 nachweisen. Auch in einer klinischen Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die pathophysiologische Bedeutung von ET-1 als Marker eines stressinduzierten Myokardinfarktes beschrieben (Wilbert-Lampen, Nickel et al. 2010).

Somit scheinen Stresshormone eine doppelt „positive“ Wirkung auf das Endothelin-System (ET-1, ET<sub>A</sub>-R) auszuüben, wodurch dies als Potenzierung der zur endothelialen Dysfunktion bis hin zum akuten Myokardinfarkt führenden Effekte interpretiert werden könnte (Abb.14).



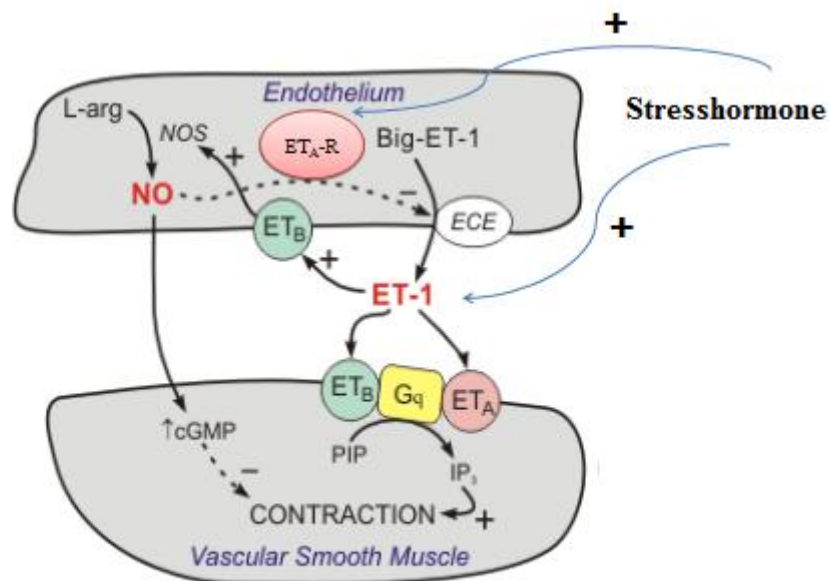


Abb.14 [modifiziert nach (Klabunde 2007)] veranschaulicht die Stresshormon-induzierte Modifikation des Endothelin-Systems: es kommt zu einer Hochregulierung der mRNA des  $ET_A$ -Rezeptors, sowie zu einer Zunahme der ET-1 Synthese. In der Folge könnte ein doppelt „positiver“ Effekt auf das Endothelin-System unter dem Einfluss von Stress gemeint sein, wodurch Stress als pro-atherogener Faktor gewertet werden könnte.

### 5.3 $ET_A$ -R unter dem Einfluss von Geschlechtshormonen

Sowohl unter dem Einfluss von  $\beta$ -Östradiol, als auch Testosteron wurde - verglichen zur unstimulierten Kontrolle - eine signifikante, bis zu 80-90%ige  $ET_A$ -Rezeptor-Herunterregulierung beobachtet, wobei kein geschlechtsspezifischer Unterschied verzeichnet werden konnte.

Die verwendeten Werte der Hormonkonzentrationen wurden einschlägiger Literatur entnommen (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005).

### 5.3.1 ET<sub>A</sub>-R unter dem Einfluss von $\beta$ -Östradiol

Die  $\beta$ -Östradiol-induzierte ET<sub>A</sub>-R - Herunterregulierung scheint mit zahlreichen anderen *in vitro* und *in vivo* Studien, welche einen ebenso inhibierenden Effekt auf das Endothelin-System unter dem Einfluss von  $\beta$ -Östradiol beobachteten, konkordant zu sein (Wingrove and Stevenson 1997; Bilsel, Moini et al. 2000; Dubey, Jackson et al. 2001; Orshal and Khalil 2004; Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005).

Auch Wang et al. dokumentierten nach  $\beta$ -Östradiolstimulation aortaler Gefäßmuskelzellen von Ratten eine Herunterregulierung der ET<sub>A</sub>-R Expression sowohl auf Gen-, als auch auf Proteinebene (Wang, Tan et al. 2001).

Widersprüchlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit präsentieren sich die Resultate einer Studie mit Kardiomyozyten von Ratten, welche keine signifikante Abnahme der ET<sub>A</sub>-R mRNA nach 24 stündiger Stimulation mit  $\beta$ -Östradiol belegte (Nuedling, van Eickels et al. 2003). Ursächlich für die konträren Ergebnisse könnte zum einen eine spezies- und organspezifische Wirkung der Sexualhormone sein. Während unsere Arbeitsgruppe sowie Wang et al. die periphere Wirkung der Geschlechtshormone an humanen Endothelzellen bzw. glatten Gefäßmuskelzellen untersuchte, analysierten Nuedling et al. die Wirkung von  $\beta$ -Östradiol an Kardiomyozyten neonataler Ratten. Zum anderen könnten die unterschiedlich verwendeten Konzentrationen ( $10^{-8}$  vs.  $10^{-7}$ ) des Sexualhormons Ursache der divergenten Ergebnisse sein, zumal konzentrationsabhängige Effekte von  $\beta$ -Östradiol beobachtet wurden (Akishita, Kozaki et al. 1998; Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005).

Ob allenfalls die in klinischen Studien beobachtete kardioprotektive Wirkung des weiblichen Sexualhormons (Mendelsohn, Karas et al. 2005) im Rahmen der postmenopausalen Substitutionstherapie (Hodis, Collins et al. 2012) auf die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte ET<sub>A</sub>-R Herunterregulierung zurückzuführen ist, wäre in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Die genauen molekularbiologischen Mechanismen, über welche Östrogene die Endothelzellfunktion verändern und modulierend auf das Endothelin-System wirken, sind bislang immer noch nicht wissenschaftlich endgültig abgeklärt. Wie in der Einleitung bereits

erläutert, müssen neben der klassischen Östrogenrezeptor (ER)-vermittelten (Akishita, Kozaki et al. 1998) Signalgebung hierfür auch ER-unabhängige, alternative Signalwege in Betracht gezogen werden (Mendelsohn, Karas et al. 2005). Beispielhaft sei die  $\beta$ -Östradiol-induzierte Aktivierung des Sigma-1-Cocain-Rezeptors (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005) oder der Östrogen-aktivierte MAPK-Signaltransduktionsweg (Nuedling, Kahlert et al. 1999) erwähnt.

Auch gilt zu klären, ob Östrogene indirekt via second-messenger Moleküle die Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors verändern. Kommt es beispielsweise post-transkriptionell durch die Östrogen-induzierte, gesteigerte Bildung von NO zu einer Herunterregulierung der ET<sub>A</sub>-R mRNA? Bewirken mehrere Botenstoffe *in vivo* bzw. eine Co-Stimulation *in vitro* (siehe Co-Stimulationsversuch 5.4) über hormonell wechselwirkende Interaktionen eine Konformationsänderung der Endothelzelle und hierüber eine Aufhebung der modifizierten ET<sub>A</sub>-R Genexpression?

Gegenständliche Fragen lassen die Notwendigkeit erkennen, weitere Studien zur Erforschung der wechselwirkenden Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene auf das Endothelin-System durchzuführen.

### 5.3.2 ET<sub>A</sub>-R unter dem Einfluss von Testosteron

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe demonstrierten unter Testosteronstimulation eine signifikante konzentrationsabhängige ET-1 Freisetzung sowohl nach Kurz- als auch nach Langzeitstimulation (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005). Analog dazu beschrieben Polderman et al. signifikant höhere ET-1 Plasmakonzentrationen bei Männern (Polderman, Stehouwer et al. 1993), wohingegen Evans et al. höhere Werte bei Frauen eruierten (Evans, Phillips et al. 1996). Männer mit gegengeschlechtlicher Hormontherapie (Mann-zu-Frau-Transsexuelle) zeigten abnehmende ET-1 Plasmakonzentrationen, hingegen induzierte eine Testosteronapplikation bei Frauen (Frau-zu-Mann-Transsexuelle) eine Erhöhung der ET-1 Plasmawerte (Polderman, Stehouwer et al. 1993). David et al. beobachteten in aortalen und mesenterialen, arteriellen Gefäßen von männlichen Ratten eine erhöhte Expression der ET-1 mRNA bei gleichzeitig (wenn auch nur gering signifikant) reduzierter ET<sub>A</sub>-R Genexpression (David, Montezano et al. 2002). Grundsätzlich herrscht weitgehend einheitlicher Konsens darüber, dass Testosteron Induktor der ET-1 Synthese und dessen Freisetzung ist.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete inhibierende Effekt von Testosteron auf die ET<sub>A</sub>-R Expression wird durch Cheng et al. bestätigt, welche *vice versa in vivo* an Ratten mit abnehmendem Serumtestosteronspiegel eine Hochregulierung der ET<sub>A</sub>-R Expression verzeichneten (Cheng, Dai et al. 2010).

Sowohl Davids Studie, als auch vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe (Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005) lassen den Schluss zu, dass es aufgrund Testosteron-stimulierter erhöhter ET-1 Konzentrationen sekundär zu einer Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors im Sinne einer Agonisten-induzierten Rezeptordesensibilisierung kommt. Dieser Regulationsmechanismus wurde bereits unter 5.2 beschrieben.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass (a) Testosteron zu einer gesteigerten ET-1 Synthese führt und (b) eine Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors induziert.

### 5.3.3 Testosteron und $\beta$ -Östradiol – möglicher Einfluss der Aromatisierung

Beim Betrachten unserer Ergebnisse wird ersichtlich, dass es bezüglich der Regulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors keinen geschlechtsspezifischen Unterschied gibt. Die prozentuale Abnahme der Expression der ET<sub>A</sub>-R mRNA nach 6, 24, 48 Stunden beträgt 80-90% sowohl unter Testosteron- als auch  $\beta$ -Östradiolstimulation.

In welchem Ausmaß *in vitro* eine Metabolisierung von Testosteron zu Östradiol durch Aromatase (Wu and von Eckardstein 2003), ein peripher u.a. von Endothelzellen exprimiertes Enzym, stattfindet und hierauf das ähnliche Expressionsmuster des ET<sub>A</sub>-Rezeptors zurückzuführen ist, ist unklar. Eine Studie von Lopes und Mitarbeitern konnte belegen, dass *in vivo* nur minimalste Konzentrationen von Testosteron in Östradiol konvertieren (Lopes, Neves et al. 2012).

## 5.4 ET<sub>A</sub>-R im Co-Stimulationsversuch (Geschlechtshormone + Stresshormone)

Nach Beobachtung der signifikant hochregulierten ET<sub>A</sub>-R mRNA nach Stresshormonstimulation (s.5.2) und der signifikant abnehmenden Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors unter dem Einfluss von

Geschlechtshormonen (s.5.3) war von Interesse zu untersuchen, inwiefern das kombinierte Einwirken der Hormone (Co-Stimulation) die ET<sub>A</sub>-R Genexpression beeinflusst. Auch gab die *in vivo* beobachtete wechselseitige inhibierende Wirkung der beiden Hormonsysteme mit Nachweis einer stressinduzierten, verminderten Geschlechtshormonkonzentration Anlass zur Durchführung des Co-Stimulationsversuchs (Chrousos, Torpy et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das erstzugegebene Stimulans die Expression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors bestimmte. Vergleicht man hinsichtlich der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors den hochregulierenden Effekt der Stresshormone und die herunterregulierende Wirkung der Geschlechtshormone, wird ein antagonistisches Verhalten beider Hormonsysteme ersichtlich.

Die in diesem Versuchsteil beobachtete, offensichtliche Wichtigkeit der Reihenfolge der Zugabe der Stimulanzen könnte anhand des Mechanismus der *allosterischen* bzw. *funktionellen Antagonisierung* erklärt werden (Burgis 2008). Allosterischer Antagonismus beschreibt die Bindung zweier Moleküle am selben Rezeptor, aber an unterschiedlichen Bindungsstellen. Nach Anheften des ersten Stimulans erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung, worüber die Effektvermittlung des zweiten Botenstoffes aufgrund suboptimaler Bindungsaffinität abgeschwächt wird. Unter dem Begriff „funktioneller Antagonismus“ werden gegenläufige Zellregulierungen, welche zwar am gleichen Zielorgan aber an unterschiedlichen zellulären Wirkorten/Rezeptoren stattfinden, subsumiert. Eine Wirkungsabschwächung ist die Folge. Diesem Verhalten entsprechend, würde beispielsweise  $\beta$ -Östradiol als erst zugegebenes Stimulans ER binden, eine Herunterregulierung der ET<sub>A</sub>-R mRNA bedingen und nachstehende, Stresshormon-vermittelte, gegenläufige hochregulierende Wirkung – zumindest für das Zeitintervall 0-48 Stunden – inhibieren.

Obwohl grundsätzlich ein affines, spezifisches Bindungsverhalten von Stress- und Geschlechtshormonen an entsprechende, spezifische Hormonrezeptoren bekannt ist, könnte dennoch auch ein konkurrierendes Rezeptorbindungsverhalten zwischen Stress- und Geschlechtshormonen vorliegen.

## 5.5 Der Einfluss des selektiven ET<sub>A</sub>-R Antagonisten BQ-123

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass BQ-123 eine signifikant Abnahme der Genexpression des ET<sub>A</sub>-Rezeptors, sowohl nach Tag 1, als auch nach Tag 3, 5 und

7 induzierte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Obwohl bis dato keine einzige weitere Studie über etwaige Veränderungen der ET<sub>A</sub>-R Genexpression unter dem Einfluss von BQ-123 vorliegt, lassen sich zahlreiche Arbeiten über *in vivo* Effekte zitieren:

Eine tierexperimentelle Studie zeigte nach Applikation von BQ-123 eine 40%ige Reduktion des Infarktgewebes - hinweisend auf eine starke anti-proliferative Eigenschaft des ET<sub>A</sub>-R Antagonisten (Kedzierski and Yanagisawa 2001).

Des Weiteren gelang der Nachweis der koronararteriellen Vasodilatation nach 60-minütiger, intrakoronarer Infusion von BQ-123 an Patienten mit bereits bekannter KHK bzw. an Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil aber noch ausbleibender koronararterieller Gefäßveränderung (Halcox, Nour et al. 2001). Auch der vasodilatierende Effekt von BQ-123 bei Transplantatvaskulopathie ist beachtlich (Larose, Behrendt et al. 2009).

Ferner quantifizierte eine aktuellere, randomisierte, doppel-blinde, placebokontrollierte Pilotstudie mittels kontrastmittelgestützter Magnetresonanztomographie die (mikrovaskuläre) myokardiale Perfusion nach ST-Hebungsinfarkt. Hierzu wurde der Verumgruppe während der Primären-PTCA BQ-123 systemisch appliziert. Nach 6 Tagen und nach 6 Monaten wurde obige genannte kardiale Bildgebung durchgeführt. Die Verumgruppe verzeichnete eine im Durchschnitt um 1,5 Sekunden verkürzte Reperfusionszeit, sowie eine Verbesserung kardialer Funktionsparameter im Vergleich zur Kontrollgruppe (Adlbrecht, Andreas et al. 2012).

Auch Spieker et al. zeigten, dass der während eines mentalen kurzminütigen Stresstests infundierte ET<sub>A</sub>-R Antagonist BQ-123 an gesunden Probanden keine Abnahme der Vasodilatation bewirkte, wohingegen die Kontrollgruppe signifikant eine Reduktion der Vasodilatation nach dem Stressereignis aufzeigte (Spieker, Hurlimann et al. 2002). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Herunterregulierung des ET<sub>A</sub>-Rezeptors unter dem Einfluss von BQ-123 könnte ursächlich für die *in vivo* dokumentierten, obige angeführten, ausbleibenden vasokonstringierenden Effekte sein.

Auf molekularbiologischer Ebene wäre vorstellbar, dass BQ-123 eine Rezeptordesensibilisierung – im Sinne eines nicht-genutzten Signalweges – induziert. Obwohl das Phänomen der Rezeptordesensibilisierung für agonistisches Verhalten beschrieben wurde (Sibley, Benovic et al. 1987; Pierce and Lefkowitz 2001), könnte die antagonistisch-induzierte, längerfristige Verhinderung der Aktivierung zytoplasmatischer Signalproteine deren Abbau bedingen.

Ob nun aber tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen einer *in vitro* beobachteten herunterregulierten mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors und einer *in vivo* nachgewiesenen Verbesserung klinischer Parameter nach BQ-123 Applikation besteht, und ob der Regulationsmechanismus der Rezeptordesensibilisierung durch ET<sub>A</sub>-R Antagonisten initiiert wird, ist ungewiss und muss Gegenstand zukünftiger Studien sein.

## 5.6 Der Einfluss des Endothelin-Konversionsenzym-Inhibitors

Das Endothelin-Konversionsenzym existiert – analog zu den Endothelinen – in 3 Isoformen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass ECE-1 in nahezu allen Gefäßendothelzellen des kardiovaskulären Systems exprimiert wird (Xu, Emoto et al. 1994), bezieht sich die nachstehende Diskussion ausschließlich auf diesen im Gefäßsystem vorkommenden Subtyp.

Analog zur Stimulation der HMEC mit BQ-123 wurde unter der Zugabe des ECE-Inhibitors zu allen interessierenden Zeitpunkten (Tag 1, 3, 5, 7) eine signifikante Reduktion der ET<sub>A</sub>-R mRNA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dokumentiert. Der Effekt war deutlicher ausgeprägt nach 3, 5, und 7 Tagen im Vergleich zum Tag 1.

Ursächlich für den herunterregulierenden Effekt könnte – ähnlich zu obig (5.5.) Diskutiertem – eine Deaktivierung der an der Effektvermittlung von ET-1 beteiligten Signalwege sein. Voraussetzung hierfür wäre das Ausbleiben der agonistischen Bindung von ET-1 am Endothelinrezeptor (ECE-I → ET-1↓). Die Zelle würde nun in einen vermindert aktiven Zustand – zumindest die das Endothelin-System regulierenden Prozesse betreffend – überführt werden. In der Folge würde Energie eingespart und hierüber die Expressionsrate des ET<sub>A</sub>-Rezeptors vermindert werden.

## 5.7 Ausblick

Nachdem Stress als eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor identifiziert, und eine Beeinflussbarkeit des Endothelin-Systems durch Stresseinwirkung bereits mehrfach belegt wurde, sollten die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen weiter erforscht werden. Die Identifizierung möglicher therapeutischer Ansätze wie z.B. die Blockade des signalvermittelnden ET<sub>A</sub>-Rezeptors oder der Einsatz eines Endothelin-Konversionsenzym-

---

Inhibitors könnte zu einer Senkung der kardialen Morbidität - und damit Verbesserung der Lebensqualität - und auch der Mortalität führen.

## **5.8 Limitation der Arbeit**

Wichtigster limitierender Faktor der vorliegenden Arbeit ist das Fehlen der Beobachtung und Beurteilung eines konzentrationsabhängigen Effektes der verwendeten Stimulanzen. Aufgrund nachgewiesener von der Konzentration der Stimulanzen abhängigen Wirkungen auf das Endothelin-System (Akishita, Kozaki et al. 1998; Wilbert-Lampen, Seliger et al. 2005; Wilbert-Lampen, Trapp et al. 2006; Pradhan, Mondal et al. 2008) ist naheliegend zu vermuten, dass auch konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte hinsichtlich der Regulierung der mRNA des ET<sub>A</sub>-Rezeptors vorliegen. Bestätigende Studien hierzu sind abzuwarten.

Des Weiteren ist darauf hinzuweisen, dass die vorliegende Arbeit ausschließlich die Stimulanzen-induzierte Veränderung der ET<sub>A</sub>-R Expression auf Genebene (RT-PCR) beschreibt. Die modifizierte Expression auf Proteinebene ist ausständig.

Ergänzend ist selbstkritisch an dieser Stelle anzumerken, dass das verwendete Studiendesign mit n=7 um zusätzliche Messungen ergänzt werden sollte, um die Plausibilität der Messungen zu erhöhen und etwaige Zufallsmessungen möglichst auszuschließen.



---

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Response to injury Hypothese – ein modernes Modell der Atherogenese – beschreibt eine Endothelschädigung oder eine Endotheldysfunktion (ET-1↑, NO↓) als initiiierendes Ereignis des atherosklerotischen Geschehens. Neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Nikotin, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Hyperlipidämie erlangt auch der Faktor Stress als Auslöser der Endothelschädigung/Endotheldysfunktion zunehmend größere Bedeutung. Nach Erkenntnis auch des wechselwirkenden Zusammenspiels zwischen Stresshormonen und dem Endothelin-System und der pathophysiologisch, klinisch relevanten Bedeutung von ET-1 bei (stressinduzierten) akuten kardialen Ereignissen wie Myokardinfarkt oder potenziell malignen Rhythmusstörungen, war die Untersuchung des Einflusses von Stress auf die Modifikation der Genexpression des Endothelin<sub>A</sub> - Rezeptors (ET<sub>A</sub>-R) primäres Ziel der vorliegenden Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Cortisol und Noradrenalin als akute Stresshormone, als auch CRH als chronisches Stresshormon im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe nach 6 stündiger Inkubation eine signifikante Hochregulierung der Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor-Expression induzierten.

Auch wurde die Bedeutung des selektiven ET<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten BQ-123, sowie des Endothelin-Konversionsenzym-Inhibitors (ECE-I) hinsichtlich ET<sub>A</sub>-R-Genexpression geprüft. Beide Faktoren führten nach 1,3,5,7 Tagen zu einer signifikanten Herunterregulierung der Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss der Geschlechtshormone auf die ET<sub>A</sub>-R Expression untersucht. Sowohl Östradiol als auch Testosteron führten zu einer signifikanten Abnahme der ET<sub>A</sub>-R Genexpression zu den gewählten Zeitpunkten (6, 24 und 48 Stunden). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied der Effekte konnte nicht dokumentiert werden. In der Co-Stimulation (Stresshormone + Geschlechtshormone) überwog der Effekt des zuerst in die Zellkultur zugegebenen Stimulans.

---

Die Bedeutung von Stress bei kardiovaskulären Erkrankungen ist hinreichend belegt. Als ein pathophysiologischer Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit das pro-atherogene Endothelin-System untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass akute und chronische Stresshormone zu einer Aktivierung des Endothelin-Systems im Sinne einer Hochregulierung der ET-1- (Nickel, Deutschmann et al. 2009) sowie der ET<sub>A</sub>-R Expression führt. Unter Berücksichtigung der weitreichenden, deletären Effekte eines dysfunktionalen, hochregulierten Endothelin-Systems sollten in weiteren Studien die Blockade des signalvermittelnden ET<sub>A</sub>-Rezeptors und / oder der Einsatz eines ECE-Inhibitors als mögliche therapeutische Ansätze erforscht werden.

---

## 7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACS	Akutes Koronarsyndrom
AngII	Angiotensin II
ADH	anti-diuretisches Hormon
ANP	atrial natriuretic peptide
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bovines Serum Albumin
CRH	Kortikotropes-releasing Hormon
ECE	Endothelin converting enzyme
ECE-I	Endothelin converting enzyme inhibitor / Endothelin-Konvertierungsenzym-Inhibitor
ET <sub>A</sub> -R	Endothelin <sub>A</sub> Rezeptor
ET <sub>B</sub> -R	Endothelin <sub>B</sub> Rezeptor
EDGF	endothelium derived growth factor
ER	Östrogen-Rezeptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
HDL	high density lipoprotein
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenocortical-axis
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzkrankheit

---

mRNA	messenger ribonucleic acid
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	monozytär chemotaktisches Protein-1
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppET	Prepro-Endothelin
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PDGF	platelet derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PH	pulmonale Hypertonie
RAAS	Renin Angiotensin Aldosteron System
SAM	sympathetic-adrenal-medullary-axis
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelium growth factor
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

"Allosterische Hemmung." [http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Thomas/seiten/enzyme/enzy2\\_2.html](http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Thomas/seiten/enzyme/enzy2_2.html).

Adlbrecht, C., M. Andreas, et al. (2012). "Systemic endothelin receptor blockade in ST-segment elevation acute coronary syndrome protects the microvasculature: a randomised pilot study." *EuroIntervention* **7**(12): 1386-1395.

Ahnstedt, H., E. Stenman, et al. (2012): "Cytokines and growth factors modify the upregulation of contractile endothelin ET(A) and ET(B) receptors in rat cerebral arteries after organ culture." *Acta Physiol* **205** (2): 266-278

Aich, P., A. A. Potter, et al. (2009). "Modern approaches to understanding stress and disease susceptibility: A review with special emphasis on respiratory disease." *Int J Gen Med* **2**: 19-32.

Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms." *Circ Res* **100**(2): 158-173.

Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds." *Circ Res* **100**(2): 174-190.

Akishita, M., K. Kozaki, et al. (1998). "Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **251**(1): 17-21.

Anwaar, I., M. Rendell, et al. (2000). "Hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women. Effects on intraplatelet cyclic guanosine monophosphate, plasma endothelin-1 and neopterin." *J Intern Med* **247**(4): 463-470.

Asano, K., T. J. Bohlmeier, et al. (2002). "Altered expression of endothelin receptors in failing human left ventricles." *J Mol Cell Cardiol* **34**(7): 833-846.

Asanuma, Y., A. Oeser, et al. (2003). "Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus." *N Engl J Med* **349**(25): 2407-2415.

Attina, T., R. Camidge, et al. (2005). "Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond." *Heart* **91**(6): 825-831.

Ba, Z. F., A. Lu, et al. (2007). "17beta-Estradiol modulates vasoconstriction induced by endothelin-1 following trauma-hemorrhage." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292**(1): H245-250.

Barton, M. (2000). "Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics." *Curr Hypertens Rep* **2**(1): 84-91.

- 
- Barton, M. and M. Yanagisawa (2008). "Endothelin: 20 years from discovery to therapy." Can J Physiol Pharmacol **86**(8): 485-498.
- Bilsel, A. S., H. Moini, et al. (2000). "17Beta-estradiol modulates endothelin-1 expression and release in human endothelial cells." Cardiovasc Res **46**(3): 579-584.
- Blankenhorn, D. H. and D. M. Kramsch (1989). "Reversal of atherosclerosis and sclerosis. The two components of atherosclerosis." Circulation **79**(1): 1-7.
- Blumenthal, J. A., H. S. Lett, et al. (2003). "Depression as a risk factor for mortality after coronary artery bypass surgery." Lancet **362**(9384): 604-609.
- Boulanger, C. M., F. C. Tanner, et al. (1992). "Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium." Circ Res **70**(6): 1191-1197.
- Bremnes, T., J. D. Paasche, et al. (2000). "Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors." J Biol Chem **275**(23): 17596-17604.
- Browatzki, M., C. A. Pfeiffer, et al. (2005). "Endothelin-1 induces CD40 but not IL-6 in human monocytes via the proinflammatory transcription factor NF-kappaB." Eur J Med Res **10**(5): 197-201.
- Burgis, E. (2008). Allgemeine und spezielle Pharmakologie. München, Urban & Fischer Verlag.
- Carney, R. M. and K. E. Freedland (2003). "Depression, mortality, and medical morbidity in patients with coronary heart disease." Biol Psychiatry **54**(3): 241-247.
- Chen, G. F. and Z. Sun (2006). "Effects of chronic cold exposure on the endothelin system." J Appl Physiol **100**(5): 1719-1726.
- Cheng, Y. S., D. Z. Dai, et al. (2010). "Testis dysfunction by isoproterenol is mediated by upregulating endothelin receptor A, leptin and protein kinase C $\alpha$  and is attenuated by an endothelin receptor antagonist CPU0213." Reprod Toxicol **29**(4): 421-426.
- Chrousos, G. P., D. J. Torpy, et al. (1998). "Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications." Ann Intern Med **129**(3): 229-240.
- Cyr, C. R., B. Rudy, et al. (1993). "Prolonged desensitization of the human endothelin A receptor in *Xenopus* oocytes. Comparative studies with the human neurokinin A receptor." J Biol Chem **268**(35): 26071-26074.
- Davenport, A. P., G. O'Reilly, et al. (1995). "Endothelin ETA and ETB mRNA and receptors expressed by smooth muscle in the human vasculature: majority of the ETA sub-type." Br J Pharmacol **114**(6): 1110-1116.

- 
- David, F. L., A. C. Montezano, et al. (2002). "Gender differences in vascular expression of endothelin and ET(A)/ET(B) receptors, but not in calcium handling mechanisms, in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension." Braz J Med Biol Res **35**(9): 1061-1068.
- Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.
- Deenadayalu, V. P., R. E. White, et al. (2001). "Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(4): H1720-1727.
- del Rincon, I. D., K. Williams, et al. (2001). "High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors." Arthritis Rheum **44**(12): 2737-2745.
- Douglas, S. A. and E. H. Ohlstein (1993). "Endothelin-1 promotes neointima formation after balloon angioplasty in the rat." J Cardiovasc Pharmacol **22** Suppl 8: S371-373.
- Dubey, R. K., E. K. Jackson, et al. (2001). "Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-independent mechanism." Hypertension **37**(2 Part 2): 640-644.
- Evans, R. R., B. G. Phillips, et al. (1996). "Racial and gender differences in endothelin-1." Am J Cardiol **78**(4): 486-488.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, et al. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-556.
- Freedman, N. J., A. S. Ament, et al. (1997). "Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity." J Biol Chem **272**(28): 17734-17743.
- Galie, N., A. Manes, et al. (2004). "The endothelin system in pulmonary arterial hypertension." Cardiovasc Res **61**(2): 227-237.
- Gornikiewicz, A., T. Sautner, et al. (2000). "Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells." FASEB J **14** (9): 1093-1100.
- Gray, G. A. and D. J. Webb (1996). "The endothelin system and its potential as a therapeutic target in cardiovascular disease." Pharmacol Ther **72**(2): 109-148.
- Grover, G. J., S. Dzwonczyk, et al. (1993). "The endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 reduces infarct size in a canine model of coronary occlusion and reperfusion." Cardiovasc Res **27**(9): 1613-1618.
- Gutstein, W. H. (1988). "The central nervous system and atherogenesis: endothelial injury." Atherosclerosis **70**(1-2): 145-154.

- 
- Haenggi, W., N. A. Bersinger, et al. (1999). "Decrease of serum endothelin levels with postmenopausal hormone replacement therapy or tibolone." Gynecol Endocrinol **13**(3): 202-205.
- Halcox, J. P., K. R. Nour, et al. (2001). "Coronary vasodilation and improvement in endothelial dysfunction with endothelin ET(A) receptor blockade." Circ Res **89**(11): 969-976.
- Hall, J., R. D. Jones, et al. (2006). "Selective inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone." Endocrinology **147**(6): 2675-2680.
- Haller, H., T. Schaberg, et al. (1991). "Endothelin increases [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, protein phosphorylation, and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production in human alveolar macrophages." Am J Physiol **261**(6 Pt 1): L478-484.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-1695.
- Hodis, H. N., P. Collins, et al. (2012). "The timing hypothesis for coronary heart disease prevention with hormone therapy: past, present and future in perspective." Climacteric **15**(3):217-28.
- Hurlimann, D., A. Forster, et al. (2002). "Anti-tumor necrosis factor-alpha treatment improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis." Circulation **106**(17): 2184-2187.
- Iafrati, M. D., R. H. Karas, et al. (1997). "Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice." Nat Med **3**(5): 545-548.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-2867.
- Jeremy, J. Y., N. Shukla, et al. (2011). "Endothelin-1 (ET-1) and vein graft failure and the therapeutic potential of ET-1 receptor antagonists." Pharmacol Res **63**(6): 483-489.
- Johnson-Leger, C., M. Aurrand-Lions, et al. (2000). "The parting of the endothelium: miracle, or simply a junctional affair?" J Cell Sci **113** ( Pt 6): 921-933.
- Johnson, E. O., T. C. Kamilaris, et al. (1992). "Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis." Neurosci Biobehav Rev **16**(2): 115-130.
- Kaddoura, S., J. D. Firth, et al. (1996). "Endothelin-1 is involved in norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in vivo. Acute effects of bosentan, an orally active, mixed endothelin ETA and ETB receptor antagonist." Circulation **93**(11): 2068-2079.
- Kannel, W. B. and A. J. Belanger (1991). "Epidemiology of heart failure." Am Heart J **121**(3 Pt 1): 951-957.
- Kannel, W. B., M. C. Hjortland, et al. (1976). "Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study." Ann Intern Med **85**(4): 447-452.



- 
- Kedzierski, R. M. and M. Yanagisawa (2001). "Endothelin system: the double-edged sword in health and disease." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 851-876.
- Khac, L. D., S. Naze, et al. (1994). "Endothelin receptor type A signals both the accumulation of inositol phosphates and the inhibition of cyclic AMP generation in rat myometrium: stimulation and desensitization." Mol Pharmacol **46**(3): 485-494.
- Kimura, Y., K. Takahashi, et al. (2002). "Expression of urocortin and corticotropin-releasing factor receptor subtypes in the human heart." J Clin Endocrinol Metab **87**(1): 340-346.
- Kirchengast, M. and M. Luz (2005). "Endothelin receptor antagonists: clinical realities and future directions." J Cardiovasc Pharmacol **45**(2): 182-191.
- Klabunde, R. E. (2007, 15.03.2007). "Cardiovascular Physiology Concepts." Retrieved 03.02.2013, from <http://www.cvpharmacology.com/vasodilator/ETblockers.htm>.
- Kooistra, T., Y. Schrauwen, et al. (1994). "Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release." Int J Hematol **59**(4): 233-255.
- Kurihara, H., M. Yoshizumi, et al. (1989). "Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **159**(3): 1435-1440.
- La, M. and J. J. Reid (1995). "Endothelin-1 and the regulation of vascular tone." Clin Exp Pharmacol Physiol **22**(5): 315-323.
- Larose, E., D. Behrendt, et al. (2009). "Endothelin-1 is a key mediator of coronary vasoconstriction in patients with transplant coronary arteriosclerosis." Circ Heart Fail **2**(5): 409-416.
- Leor, J., W. K. Poole, et al. (1996). "Sudden cardiac death triggered by an earthquake." N Engl J Med **334**(7): 413-419.
- Lerman, A., B. S. Edwards, et al. (1991). "Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis." N Engl J Med **325**(14): 997-1001.
- Lerman, A., D. R. Holmes, Jr., et al. (1995). "Endothelin in coronary endothelial dysfunction and early atherosclerosis in humans." Circulation **92**(9): 2426-2431.
- Levin, E. R. (1995). "Endothelins." N Engl J Med **333**(6): 356-363.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lopes, R. A., K. B. Neves, et al. (2012). "Testosterone and vascular function in aging." Front Physiol **3**: 89.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). "Histologie." Retrieved 11.03., 2013, from [https://www.thieme.de/detailseiten/musterseiten/pdf/9783131292438\\_241\\_255.pdf](https://www.thieme.de/detailseiten/musterseiten/pdf/9783131292438_241_255.pdf).

- 
- Luscher, T. F. (1992). "Endothelin: systemic arterial and pulmonary effects of a new peptide with potent biologic properties." Am Rev Respir Dis **146**(5 Pt 2): S56-60.
- Luscher, T. F. and M. Barton (2000). "Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs." Circulation **102**(19): 2434-2440.
- MacLean, M. R. (1998). "Endothelin-1: a mediator of pulmonary hypertension?" Pulm Pharmacol Ther **11**(2-3): 125-132.
- Maier, W., L. A. Altwegg, et al. (2005). "Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein." Circulation **111**(11): 1355-1361.
- Malendowicz, L. K., A. S. Belloni, et al. (1998). "Arginine-vasopressin and corticotropin-releasing hormone are sequentially involved in the endothelin-1-induced acute stimulation of rat pituitary-adrenocortical axis." J Steroid Biochem Mol Biol **66**(1-2): 45-49.
- Martin-Nizard, F., H. S. Houssaini, et al. (1991). "Modified low density lipoproteins activate human macrophages to secrete immunoreactive endothelin." FEBS Lett **293**(1-2): 127-130.
- McLean, M. and R. Smith (2001). "Corticotrophin-releasing hormone and human parturition." Reproduction **121**(4): 493-501.
- Meisel, S. R., I. Kutz, et al. (1991). "Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians." Lancet **338**(8768): 660-661.
- Mencke, T. (1997). DNA-Polymorphismus des endothelialen leukozytären Adhäsionsmoleküls-1 bei Patienten (unter 50 Jahren) mit interventionsbedürftigen Koronararterienstenosen Diss.
- Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (1994). "Estrogen and the blood vessel wall." Curr Opin Cardiol **9**(5): 619-626.
- Mendelsohn, M.E. and R.H.Karas (2005): "Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences." SCIENCE **308**: 1583-1587.
- Minamino, T., H. Kurihara, et al. (1997). "Endothelin-converting enzyme expression in the rat vascular injury model and human coronary atherosclerosis." Circulation **95**(1): 221-230.
- Miyauchi, T., M. Yanagisawa, et al. (1992). "Age- and sex-related variation of plasma endothelin-1 concentration in normal and hypertensive subjects." Am Heart J **123**(4 Pt 1): 1092-1093.
- Miyauchi, T., M. Yanagisawa, et al. (1989). "Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction." Lancet **2**(8653): 53-54.

- 
- Molenaar, P., G. O'Reilly, et al. (1993). "Characterization and localization of endothelin receptor subtypes in the human atrioventricular conducting system and myocardium." Circ Res **72**(3): 526-538.
- Morey, A. K., M. Razandi, et al. (1998). "Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1." Biochem J **330** ( Pt 3): 1097-1105.
- Mormede, P. and E. Terenina (2012). "Molecular genetics of the adrenocortical axis and breeding for robustness." Domest Anim Endocrinol **43**(2): 116-131.
- Mylona, P. and J. G. Cleland (1999). "Update of REACH-1 and MERIT-HF clinical trials in heart failure. Cardio.net Editorial Team." Eur J Heart Fail **1**(2): 197-200.
- Nathan, L. and G. Chaudhuri (1997). "Estrogens and atherosclerosis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 477-515.
- Nelson, J., A. Bagnato, et al. (2003). "The endothelin axis: emerging role in cancer." Nat Rev Cancer **3**(2): 110-116.
- Nickel, T., A. Deutschmann, et al. (2009). "Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones." Microvasc Res **78**(3): 364-369.
- Nuedling, S., S. Kahlert, et al. (1999). "Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes." FEBS Lett **454**(3): 271-276.
- Nuedling, S., M. van Eickels, et al. (2003). "17 Beta-estradiol regulates the expression of endothelin receptor type B in the heart." Br J Pharmacol **140**(1): 195-201.
- Oie, E., L. E. Vinge, et al. (1997). "Transient, isopeptide-specific induction of myocardial endothelin-1 mRNA in congestive heart failure in rats." Am J Physiol **273**(4 Pt 2): H1727-1736.
- Omland, T., R. T. Lie, et al. (1994). "Plasma endothelin determination as a prognostic indicator of 1-year mortality after acute myocardial infarction." Circulation **89**(4): 1573-1579.
- Orshal, J. M. and R. A. Khalil (2004). "Gender, sex hormones, and vascular tone." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **286**(2): R233-249.
- Otte, C., C. R. Marmar, et al. (2004). "Depression and 24-hour urinary cortisol in medical outpatients with coronary heart disease: The Heart and Soul Study." Biol Psychiatry **56**(4): 241-247.
- Otte, C., T. C. Neylan, et al. (2005). "Depressive symptoms and 24-hour urinary norepinephrine excretion levels in patients with coronary disease: findings from the Heart and Soul Study." Am J Psychiatry **162**(11): 2139-2145.
- Papadogeorgos, N. O., M. Bengtsson, et al. (2009). "Selective endothelin A-receptor blockade attenuates coronary microvascular dysfunction after coronary stenting in patients with type 2 diabetes." Vasc Health Risk Manag **5**: 893-899.

- 
- Peltonen, T., P. Taskinen, et al. (2009). "Increase in tissue endothelin-1 and ETA receptor levels in human aortic valve stenosis." Eur Heart J **30**(2): 242-249.
- Pierce, K. L. and R. J. Lefkowitz (2001). "Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors." Nat Rev Neurosci **2**(10): 727-733.
- Pilz, H. (2004). "Endothel - Endotheldysfunktion - Hypertonie." <http://www.kup.at/kup/pdf/3944.pdf>, Journal für Hypertonie.
- Polderman, K. H., C. D. Stehouwer, et al. (1993). "Influence of sex hormones on plasma endothelin levels." Ann Intern Med **118**(6): 429-432.
- Pradhan, L., D. Mondal, et al. (2008). "Molecular analysis of cocaine-induced endothelial dysfunction: role of endothelin-1 and nitric oxide." Cardiovasc Toxicol **8**(4): 161-171.
- Rakugi, H., Y. Tabuchi, et al. (1990). "Evidence for endothelin-1 release from resistance vessels of rats in response to hypoxia." Biochem Biophys Res Commun **169**(3): 973-977.
- Remuzzi, G., N. Perico, et al. (2002). "New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations." Nat Rev Drug Discov **1**(12): 986-1001.
- Roman, M. J., B. A. Shanker, et al. (2003). "Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **349**(25): 2399-2406.
- Rosenfeld, L. (1989). "Atherosclerosis and the cholesterol connection: evolution of a clinical application." Clin Chem **35**(4): 521-531.
- Rosengren, A., S. Hawken, et al. (2004). "Association of psychosocial risk factors with risk of acute myocardial infarction in 11119 cases and 13648 controls from 52 countries (the INTERHEART study): case-control study." Lancet **364**(9438): 953-962.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
- Rozanski, A., J. A. Blumenthal, et al. (1999). "Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy." Circulation **99**(16): 2192-2217.
- Rubanyi, G. M. and M. A. Polokoff (1994). "Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology." Pharmacol Rev **46**(3): 325-415.
- Sakai, S., T. Miyauchi, et al. (1996). "Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure." Nature **384**(6607): 353-355.
- Saphier, P. W., M. Faria, et al. (1992). "A comparison of the clearance of ovine and human corticotrophin-releasing hormone (CRH) in man and sheep: a possible role for CRH-binding protein." J Endocrinol **133**(3): 487-495.
- Schini, V. B., H. Hendrickson, et al. (1989). "Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells." Eur J Pharmacol **165**(2-3): 333-334.

- 
- Shaul, P. W. (2000). "Novel role of estrogen receptors in vascular endothelium." Semin Perinatol **24**(1): 70-74.
- Sibley, D. R., J. L. Benovic, et al. (1987). "Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation." Cell **48**(6): 913-922.
- Simoncini, T., R. Apa, et al. (1999). "Human umbilical vein endothelial cells: a new source and potential target for corticotropin-releasing factor." J Clin Endocrinol Metab **84**(8): 2802-2806.
- Spieker, L. E., D. Hurlimann, et al. (2002). "Mental stress induces prolonged endothelial dysfunction via endothelin-A receptors." Circulation **105**(24): 2817-2820.
- Statistisches Bundesamt. (2011, 23.09.2011). "2010: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachten rund 41 % aller Todesfälle." Retrieved 03.02.2013, from [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11\\_354\\_232.html](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11_354_232.html).
- Stewart, D. J., G. Kubac, et al. (1991). "Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **18**(1): 38-43.
- Sullivan, T. R., Jr., R. H. Karas, et al. (1995). "Estrogen inhibits the response-to-injury in a mouse carotid artery model." J Clin Invest **96**(5): 2482-2488.
- Tanfin, Z. and M. Breuiller-Fouche (2012). "The endothelin axis in uterine leiomyomas: new insights." Biol Reprod **87**(1): 5, 1-10.
- Tanimura, A., T. Cho, et al. (1986). "Role of "wave line" (Doerr; Wellenlinie) of aorta in atherosclerosis." Angiology **37**(4): 272-280.
- Tegos, T. J., E. Kalodiki, et al. (2001). "The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review." Angiology **52**(2): 89-98.
- Todaro, J. F., B. J. Shen, et al. (2003). "Effect of negative emotions on frequency of coronary heart disease (The Normative Aging Study)." Am J Cardiol **92**(8): 901-906.
- Tomoda, H. (1993). "Plasma endothelin-1 in acute myocardial infarction with heart failure." Am Heart J **125**(3): 667-672.
- Treiber, F. A., G. K. Kapuku, et al. (2002). "Plasma endothelin-1 release during acute stress: role of ethnicity and sex." Psychosom Med **64**(5): 707-713.
- Triggle, C. R., S. M. Samuel, et al. (2012). "The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways." Can J Physiol Pharmacol **90**(6): 713-738.
- Tsujino, M., Y. Hirata, et al. (1995). "Nonselective ETA/ETB receptor antagonist blocks proliferation of rat vascular smooth muscle cells after balloon angioplasty." Life Sci **56**(25): PL449-454.

- 
- van der Wal, A. C., A. E. Becker, et al. (1994). "Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology." Circulation **89**(1): 36-44.
- Wackenfors, A., M. Emilsson, et al. (2004). "Ischemic heart disease induces upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries." Eur J Pharmacol **484**(1): 103-109.
- Wagner, O. F., G. Christ, et al. (1992). "Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells." J Biol Chem **267**(23): 16066-16068.
- Wanecek, M., E. Weitzberg, et al. (2000). "The endothelin system in septic and endotoxin shock." Eur J Pharmacol **407**(1-2): 1-15.
- Wang, R. and R. H. Dashwood (2011). "Endothelins and their receptors in cancer: identification of therapeutic targets." Pharmacol Res **63**(6): 519-524.
- Wang, T. H., Z. Tan, et al. (2001). "[Down-regulation of ETA receptor of vascular smooth muscle cells by 17 beta-estradiol]." Sheng Li Xue Bao **53**(5): 380-384.
- Wang, X., D. A. Barber, et al. (1997). "Gender and transcriptional regulation of NO synthase and ET-1 in porcine aortic endothelial cells." Am J Physiol **273**(4 Pt 2): H1962-1967.
- Wang, X., S. A. Douglas, et al. (1996). "Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty-induced neointimal formation in the rat." Circ Res **78**(2): 322-328.
- Webb, C. M., M. A. Ghatei, et al. (2000). "17beta-estradiol decreases endothelin-1 levels in the coronary circulation of postmenopausal women with coronary artery disease." Circulation **102**(14): 1617-1622.
- Weiner, C. P., I. Lizasoain, et al. (1994). "Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 5212-5216.
- Whooley, M. A., P. de Jonge, et al. (2008). "Depressive symptoms, health behaviors, and risk of cardiovascular events in patients with coronary heart disease." JAMA **300**(20): 2379-2388.
- Wick, G., H. Perschinka, et al. (1999). "Autoimmunity and atherosclerosis." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S444-449.
- Wilbert-Lampen, U., D. Leistner, et al. (2008). "Cardiovascular events during World Cup soccer." N Engl J Med **358**(5): 475-483.
- Wilbert-Lampen, U., T. Nickel, et al. (2010). "Modified serum profiles of inflammatory and vasoconstrictive factors in patients with emotional stress-induced acute coronary syndrome during World Cup Soccer 2006." J Am Coll Cardiol **55**(7): 637-642.

- 
- Wilbert-Lampen, U., C. Seliger, et al. (2005). "Female sex hormones decrease constitutive endothelin-1 release via endothelial sigma-1/cocaine receptors: an action independent of the steroid hormone receptors." Endothelium **12**(4): 185-191.
- Wilbert-Lampen, U., F. Straube, et al. (2006). "Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2: a potential link between mood disorders and endothelial dysfunction?" J Cardiovasc Pharmacol **47**(1): 110-116.
- Wilbert-Lampen, U., A. Trapp, et al. (2006). "Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on endothelin-1 and NO release, mediated by CRH receptor subtype R2: a potential link between stress and endothelial dysfunction?" J Psychosom Res **61**(4): 453-460.
- Wingrove, C. S. and J. C. Stevenson (1997). "17 beta-Oestradiol inhibits stimulated endothelin release in human vascular endothelial cells." Eur J Endocrinol **137**(2): 205-208.
- Wolfe, F., B. Freundlich, et al. (2003). "Increase in cardiovascular and cerebrovascular disease prevalence in rheumatoid arthritis." J Rheumatol **30**(1): 36-40.
- World Health Organization (1958). "CLASSIFICATION of atherosclerotic lesions; report of a study group." World Health Organ Tech Rep Ser **57**(143): 1-20.
- Wu, F. C. and A. von Eckardstein (2003). "Androgens and coronary artery disease." Endocr Rev **24**(2): 183-217.
- Xu, D., N. Emoto, et al. (1994). "ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1." Cell **78**(3): 473-485.
- Xu, J., N. Li, et al. (2008). "The endothelin receptor antagonist CPU0213 is more effective than aminoguanidine to attenuate isoproterenol-induced vascular abnormality by suppressing overexpression of NADPH oxidase [correction of oxidas], ETA, ETB, and MMP9 in the vasculature." J Cardiovasc Pharmacol **52**(1): 42-48.
- Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-415.
- Yasuda, M., M. Kohno, et al. (1990). "Circulating immunoreactive endothelin in ischemic heart disease." Am Heart J **119**(4): 801-806.
- Ylikorkala, O., A. Orpana, et al. (1995). "Postmenopausal hormonal replacement decreases plasma levels of endothelin-1." J Clin Endocrinol Metab **80**(11): 3384-3387.
- Yusuf, S., S. Hawken, et al. (2004). "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study." Lancet **364**(9438): 937-952.
- Zeicher, A. M., H. Goebel, et al. (1995). "Tissue endothelin-1 immunoreactivity in the active coronary atherosclerotic plaque. A clue to the mechanism of increased vasoreactivity of the culprit lesion in unstable angina." Circulation **91**(4): 941-947.

---

Zolk, O., J. Quattek, et al. (1999). "Expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme, and endothelin receptors in chronic heart failure." Circulation **99**(16): 2118-2123.



---

## 9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Ute Wilbert-Lampen für die Bereitstellung dieses äußerst interessanten Themas, die Diskussionsbereitschaft, Anregung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich mich bei Frau Dr. med. Claudia Summo für die großartige, kompetente, konsequente Betreuung bedanken. Sie stand Rückfragen jederzeit zur Verfügung, zeigte Geduld und Hilfsbereitschaft, begeisterte für das Thema und bewies unermüdliches Engagement und Unterstützungsgabe für das Gelingen dieser Arbeit. Sie ermöglichte regelmäßige Treffen und verhalf mir durch wertvolle, freundschaftliche Ratschläge zur raschen Fertigstellung meiner Arbeit. Zudem möchte ich mich für die Unterstützung an der Teilnahme am 119. Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (Wiesbaden 2013) herzlichst bedanken.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Übernahme der Arbeit an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I an der LMU München.

Ein großes Dankeschön gilt auch den labortechnischen Assistenten Zeljka Sisic und Marius Lambert. Herzlichen Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die zahl- und lehrreichen Arbeitsstunden im Labor, das unermüdliche Engagement mir labortechnische Methoden gewissenhaft zu erlernen, die große Unterstützung in der Versuchsdurchführung und das angenehme Arbeitsklima.

Der größte Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Ohne deren fortwährende, liebevolle und vielseitige Unterstützung in jeglicher Hinsicht, deren unumstößliche Geduld und deren stärkende, einfühlsame, aufmunternde Worte wären weder meine hochschulmedizinische Ausbildung, noch meine Umsetzung der Promotion möglich gewesen. Danke für alles!

## **10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Bei der Verfassung der Dissertation wurden keine anderen, als die im Text angeführten Hilfsmittel, verwendet.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Wien, den 30.03.2015

Anna Maria Elisabeth Sautner